Spektroskopische und photochemische Untersuchungen an chlorophyllhaltigen Netzmittelmizellen

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Brigitte Renate Wagner

aus Berlin

1969

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543901_0071

Spektroskopische und photochemische Untersuchungen an chlorophyllhaltigen Netzmittelmizellen

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Brigitte Renate Wagner

aus Berlin

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG · Tübingen

Tag der mündlichen Prüfung: 24. April 1969

Dekan: Prof. Dr. A. Seilacher
1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Metzner
2. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Schwemmle

INHALT

I EINLEITUNG

II EXPERIMENTELLER TEIL

IIA METHODIK

Anzucht von Algen

Gewinnung von Chlorophyll a

Benutzte Meßgeräte

Chemie der verwendeten Trägersubstanzen

IIB ERGEBNISSE

Absorptionsspektren der Chlorophyll-Träger-Komplexe bei verschiedenen Molaritäten

Beständigkeit der Komplexe

Fluoreszenzspektren der Chlorophyll-Träger-Komplexe

III DISKUSSION

IV ZUSAMMENFASSUNG

V LITERATURNACHWEIS

I. EINLEITUNG

Die Bindung der Photosynthese an die chlorophyllhaltigen Plastiden wurde durch SACHS (1862) bewiesen, der als erster zeigen konnte, daß belichtete Chloroplasten Stärkekörner ablagern. ENGELMANN (1881, 1894) ergänzte diesen Befund durch seine Beobachtung, daß nur die Chloroplasten Sauerstoff entwickeln. ENGELMANN (1882, 1883, 1884) verdanken wir auch die ersten Experimente über die Spektralabhängigkeit der Kohlensäure-Assimilation. Die von ihm aufgenommenen Daten veranlaßten ihn bereits zu der Forderung, daß die Lichtenergie nicht allein vom Chlorophyll, sondern auch von den Begleitpigmenten nutzbar gemacht werden kann; zu diesen Farbstoffen rechnete er das Fucoxanthin der Diatomeen und Phaeophyceen sowie Phycoerythrin und Phycocyanin bei Rhodo- und Cyanophyceen. Bedingt durch ihre Lokalisation innerhalb der Chloroplasten besteht zwischen diesen "accessorischen" Pigmenten und dem Chlorophyll ein enger räumlicher Kontakt (vgl. EMERSON und LEWIS 1942, HAXO und BLINKS 1950, TANADA 1951).

Nachdem FÖRSTER (1951) die Möglichkeit einer Resonanzübertragung von Anregungsenergien diskutiert hatte, vertrat vor allem DUYSENS (1951, 1952) die Auffassung, daß alle von den Chromatophorenpigmenten absorbierte Energie durch diesen Leitungsmechanismus auf denjenigen Farbstoff konzentriert wird, dessen erster angeregter Singulett-Zustand das niedrigste Energieniveau aufweist. Die heutigen Photosynthese-Theorien gehen in der Regel davon aus, daß diese "Endstation" beim

Chlorophyll a - oder einer besonderen Chlorophyll a-Form - liegt. Eine Energieleitung ist aber nicht nur zwischen verschiedenen Verbindungen möglich; sie kann auch zwischen benachbarten Molekülen identischer Struktur stattfinden. Demnach müßte Chlorophyll seine Anregungsenergie an andere Chlorophyllmoleküle weitergeben können. Viele Beobachtungen sprechen dafür, daß in der lebenden Zelle tatsächlich nicht das einzelne Chlorophyllmolekül wirksam wird, sondern daß es Teil einer sog. "Chlorophyll-Einheit" (EMERSON und ARNOLD 1933) ist, innerhalb der mehrere hundert Einzelmoleküle energetisch "zusammenarbeiten".

Dieser Zusammenschluß der Sensibilisatormoleküle zu größeren Komplexen gewinnt ein besonderes Interesse durch die Tatsache, daß es sich beim photosynthetischen Primärprozeß um einen Mehrquantenprozeß handeln muß (vgl. KOK 1960). Aus diesem Grunde kommt Untersuchungen über die Eigenschaften größerer Chlorophyllkomplexe besondere Bedeutung zu. Bei optischen Messungen erweist sich das Chlorophyll a-Band der lebenden Zellen um etwa 10 nm zum Langwelligen hin verschoben. Die Befürchtung, dieser Effekt könne durch die starke Streuung bei der Aufnahme der in vivo-Spektren nur vorgetäuscht sein, konnte von SIDKO, TERSKOV und EROSHIN (1964) ausgeräumt werden. Unklar bleibt aber bis heute, wie diese Spektralverschiebung zu deuten ist. Mehrere Autoren möchten sie allein auf die Bildung von Dimeren oder höheren Aggregaten zurückführen (vgl. z. B. BRODY und BRODY 1966), andere sind der Auffassung, die Verschiebung erkläre sich allein aus der Anheftung an ein

Trägermolekül der Chloroplastenlamellen (WASSINK 1939).

Nachdem HILL (1937) hatte zeigen können, daß vorsichtig isolierte Chloroplasten noch zur Sauerstoffabscheidung - und damit zu einem Teilprozeß der Photosynthese - befähigt sind, konzentrierte sich das Interesse verschiedener Arbeitsgruppen auf die Frage, ob sich die photolytische Wasserspaltung auch durch einfachere Systeme erreichen läßt. Schon vor den HILLschen Experimenten hatten EISLER und PORTHEIM (1922) sowie NOACK (1927) Komplexe hergestellt, indem sie molekular gelöstes Chlorophyll mit Eiweißlösungen in Kontakt brachten. Es entstanden gefärbte Fällungen, die als wasserlöslich und fluoreszenzfähig beschrieben wurden. Ihr Spektrum wurde von EISLER und PORTHEIM als "ähnlich dem von Blättern" bezeichnet. SEYBOLD und EGLE (1940) äußerten aber nach ihren späteren Nachuntersuchungen der NOACKschen Experimente den Verdacht, daß die seinerzeit beobachtete Fluoreszenz nicht vom Chlorophyll, sondern von Verunreinigungen des Trägermaterials hergerührt habe. Besonders interessant erscheinen die von RODRIGO (1955) im Rahmen seiner Dissertation beschriebenen Komplexe, die er durch Fällung von chlorophyllfreien Blattproteinen (aus Pelargonium zonale) mit einer konzentrierten acetonischen Chlorophyll-Lösung erhielt. Angeblich sollen diese Proteinpräparate eine echte Hill-Reaktion ergeben haben. Ähnliche Ergebnisse werden von MASLOVA (1956) und von VISHNIAC (1957) beschrieben. MASLOVA stellte ein künstliches System aus entfettetem Eidotter und Chlorophyll her; es soll eine Hill-Reaktion mit Ferricyanid geliefert haben; VISHNIAC

arbeitete mit einem nachträglich angefärbten Spinat-Protein und konnte durch NADPH in Gegenwart von Glutathion-Reduktase Glutathion-SS in Glutathion-SH überführen. LYNCH und FRENCH (1957) konnten in ähnlichen Experimenten eine Reduktion von Dinitrophenol-indophenol nachweisen.

Leider sind chlorophylltragende Eiweißpräparate noch immer schwer zu definieren. NEKRASOV, KOBOSEV und KOMMISSAROV (1962) benutzten daher bei ihren Versuchen einfachere Trägermaterialien, u.a. das synthetische Polyamid "Kapron". Ganz entsprechend verwendeten KARJAGIN und CMUTINA (1965) Hydroxymethylpolyamid (MG 20.000) als Träger. Bei allen diesen Experimenten erwies sich das Fluoreszenzmaximum um etwa 5 nm zu kürzeren Wellenlängen hin verschoben. Im Gegensatz dazu stellten KOMMISSAROV, NEKRASOV und KOBOSEV (1965) bei Polycaprolactamharzen als Chlorophylllträgern keine Verschiebung der Absorptionsbande fest. Dagegen erhielten die gleichen Autoren bei der Herstellung kolloiden Chlorophylls - durch Zugabe von Wasser zu äthanolischen Chlorophyllösungen - eine Verschiebung des langwelligen Absorptionsgipfels bis zu 672 nm.

Diese wenigen Befunde, die noch durch eine ganze Reihe von Beobachtungen an Chloroplastenbruchstücken und mittels Netzmitteln hergestellter Plastidenfragmente ergänzt werden könnten, zeigen, daß über das optische Verhalten gebundenen Chlorophylls sehr widersprüchliche Angaben vorliegen. Über die photochemischen Fähigkeiten solcher "Plastidenmodelle" ist wenig Sicheres bekannt. In der vorliegenden Arbeit sollte daher versucht werden, künstliche Chlorophyll-Träger-Komplexe

herzustellen und ihre optischen Eigenschaften und photochemischen Fähigkeiten zu charakterisieren.

II. EXPERIMENTELLER TEIL

A Methodik

a) Anzucht der Algen: Als Ausgangsmaterial zur Gewinnung von Chlorophyll a wurde die Rhodophycee Porphyridium cruentum NÄGELI aus der Familie der Bangioideen benutzt. Die Alge wurde als Flüssigkeitskultur vom Biophysical Laboratory der Universität Leiden, Holland, bezogen.[1] Sie soll auf eine ehemals von PRINGSHEIM isolierte Kultur zurückgehen.

Da Porphyridium als Rhodophycee kein Chlorophyll b besitzt, ist sie zur Darstellung von reinem Chlorophyll a besonders gut geeignet. In lebenden Rotalgen sind das Chlorophyll und die Begleitcarotinoide durch die wasserlöslichen Farbstoffe Phycoerythrin und Phycocyanin verdeckt. Bei Porphyridium cruentum liegen B-Phycoerythrin und als Begleitcarotinoide β-Carotin, Zeaxanthin und α-Kryptoxanthin vor (BECKER 1967).

Die Anzucht der einzelligen Alge erfolgte innerhalb eines auf +20 $\pm$ 1°C thermostatisierten Wasserbades in Durchlüftungsröhren von je 250 ml Inhalt im Dauerlicht einer Leuchtstoffröhrenkombination aus 3 OSRAM-Leuchten HNW 40 W und 2 OSRAM-Leuchten 40 W/15-1 xmY (vgl. SENGER 1964). Die Beleuchtungsintensität innerhalb der Kulturröhren betrug bei einem Abstand der Leuchtstoffröhren von 20 cm vom Wasserbad ca. 4000 Lux.

Die Algensuspension wurde durch ein 0,5 cm starkes Belüftungsröhrchen mit einem Luft-CO_2-Gemisch (97:3) begast. Als Nährme-

---

1) Für die Überlassung der Kulturen bin ich Herrn Dr. HOOGENHOUT zu Dank verpflichtet.

dium wurde künstliches Seewasser nach JONES, SPEER und KURY (1963) verwendet. Da sich der Bakterienbefall wegen des hohen Salzgehaltes als sehr gering erwies, brauchten die Kulturen nicht steril gehalten zu werden.

Zusammensetzung des Nährmediums	(Angaben in mg/l)
$NaCl$	27000
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	6600
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	5600
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1500
KNO_3	1000
KH_2PO_4	70
$NaHCO_3$	40
$ZnCl_2$	0,04
H_3BO_3	0,60
$COCl_2 \cdot 6H_2O$	0,015
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,04
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,40
$(NH_4)_6MO_7O_{24} \cdot 4H_2O$	0,37
1m Trispuffer pH 7,6	20 ml/l
Eisenkomplexlösung	1 ml/l[1)]

Der pH-Wert der Lösung betrug 7,4; die verwendeten Substanzen waren analysenrein.

Zum Zeitpunkt der Verarbeitung waren die Kulturen durchschnittlich vier Tage alt. Zur Chlorophyllgewinnung wurden je Trennvorgang vier Röhren, d.h. ca. 1000 ml Algensuspension (entsprechend 28 g Algenmasse) eingesetzt.

---

1) 240 mg $FeCl_3 \cdot 4H_2O$ in 100 ml 0,05 m Na_2EDTA pH 7,6

b) Gewinnung von Chlorophyll a: Zur Gewinnung von Chlorophyll a wurden die Zellen mit ca. 5000 U/min. zehn Minuten lang aus der Nährlösung abzentrifugiert und zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Zur Entfernung störender Begleitsubstanzen wurde mit 40%igem Aceton vorextrahiert (etwa 45 Min.). Der Vorextrakt, in dem sich ein Teil der Phycobiline befand, wurde verworfen. Es folgte die 45-minütige Extraktion mit reinem Aceton (bei ca. +7°C und Dunkelheit). Dann wurde dekantiert und abermals bei gleichen Bedingungen extrahiert. Nach anschliessendem Dekantieren befanden sich das Chlorophyll a und die Carotinoide im Acetonextrakt; die zurückbleibenden Algen waren rotviolett gefärbt.

Die Auftrennung des Pigmentgemisches erfolgte in einem halbautomatischen 40-stufigen Gegenstromverteiler der Fa. RETTBERG / Göttingen. Bei diesem Gerät waren die normalen Schlauchverbindungen durch Kugelschliffe ersetzt worden, um Verunreinigungen durch herausgelöste Substanzen, z.B. Weichmacher, zu vermeiden (vgl. METZNER und STRUSS 1963). Die Apparatur arbeitet nach dem von CRAIG (1944) ausgearbeiteten Verfahren, wobei ein Substanzgemisch zwischen zwei begrenzt mischbaren, gegeneinander abgesättigten Lösungsmitteln aufgetrennt wird. Das schwerere Lösungsmittel, die stationäre Phase (= Unterphase), bleibt stehen, während das leichtere, die mobile Phase (= Oberphase), wandert. Die Komponenten des Substanzgemisches werden von der mobilen Phase ihrer Löslichkeit entsprechend mitgenommen, von der stationären entsprechend festgehalten (vgl. auch HECKER 1955).

Als Lösungsmittelpaar wurde 94%iges Methanol (Unterphase) und Petroläther (Siedebereich 40 - 60°C), als Oberphase eingesetzt. Die Pigmente des Acetonextraktes mußten deshalb in eine der beiden Phasen überführt werden. Dazu wurde der Extrakt in einen Scheidetrichter gegeben und mit destilliertem Wasser auf ca. 75 % verdünnt, da reines Aceton mit Petroläther eine homogene Phase bildet. Nun ließen sich die Pigmente bis auf einen kleinen Rest Xanthophyll, der im Aceton zurückblieb, in den Petroläther überführen. Das Petroläther-Pigment-Gemisch wurde zum Entfernen des restlichen Acetons leicht mit destilliertem Wasser gewaschen und auf 25 ml eingeengt; es konnte so zur Trennung in den Gegenstromverteiler gegeben werden. Zuvor waren die Röhrchen bereits mit der Unterphase, die durch Schütteln mit Petroläther gesättigt war, gefüllt worden. Jedes Schüttelröhrchen enthielt genau 25 ml Unterphase. Nun wurde Röhrchen 2 der Apparatur mit reiner Oberphase gefüllt, die während des nachfolgenden Arbeitsganges vor dem Substanzgemisch transportiert wird und so ein nochmaliges Absättigen in beiden Phasen ermöglicht.

Röhrchen 1 wurde mit dem zu trennenden Pigmentgemisch beschickt.

Zunächst hatten beide Phasen engen Kontakt miteinander durch 2 Minuten Schütteln. Dann folgte eine Ruhezeit von ca. 5 Minuten. Durch Senkrechtstellen der Schüttelröhrchen konnte anschließend die Oberphase in die Überlaufgefäße gebracht werden. Durch Zurückkippen gelangte sie in das jeweils nächste Röhrchen. Nun folgten erneut 2 Minuten Schütteln usw. Nach jeder Ruhezeit gelangten aus einem Vorratsgefäß 25 ml frischer Oberphase in das Röhrchen 1.

Während des Trennvorganges stand die Apparatur in einem kühlen, verdunkelten Raum.
Nach beendeter Trennung befand sich das Chlorophyll a, das einen mittleren Verteilungskoeffizienten besitzt, in den Röhrchen 15 bis 36, vorwiegend in der Oberphase, zum Teil auch in der Unterphase gelöst. β-Carotin war infolge seines hohen Verteilungskoeffizienten am weitesten gewandert (Röhrchen 30 bis 38 in der Oberphase), während sich die Xanthophylle in den Röhrchen 1 bis 11 in der Unterphase befanden.

Unter Berücksichtigung der von STRUSS (1963) aufgestellten Verteilungskurve der Pigmente wurde das zur Weiterverarbeitung bestimmte Chlorophyll a den Röhrchen 20 bis 28 entnommen. Das in der Unterphase gelöste Chlorophyll a wurde durch Zugabe von frischer Oberphase und etwas destilliertem Wasser in Petroläther überführt, um möglichst viel Chlorophyll zu erhalten.

Die Gesamtchlorophyllmenge wurde aus der Extinktion, gemessen bei λ = 662 nm (in 85%igem Aceton), und dem Extinktionskoeffizienten $\varepsilon\,\% = E^{1\%}_{1cm} = 10^{-1} \cdot \varepsilon$ berechnet (vgl. HAGER 1966, s. auch RÖBBELEN 1957, GOODWIN 1965, METZNER, RAU und SENGER 1965, ZIEGLER und EGLE 1965 und BECKER 1967).

Der Extinktionskoeffizient ist auf die Konzentration C = 1 g/100 cm^3 und auf die Schichtdicke d = 1 cm bezogen.

$$C\left[\frac{g}{100\ cm}\right] = \frac{E}{E^{1\%}_{1cm}}$$

Eine unbekannte Menge Xg des Chlorophylls in Y cm^3 eines Lösungsmittels kann danach aus der gemessenen Extinktion berechnet werden:

$$X = \frac{E \cdot Y}{E^{1\%}_{1cm} \cdot 100}$$

Eine Korrektur der Berechnung für das bei gleicher Wellenlänge absorbierende Chlorophyll b entfiel, da nur Chlorophyll a vorlag. Anschließend wurde eine konstante Chlorophyllmenge durch Einengen der Lösung auf 100 γ/ml = 1,1 · 10^{-4} mol eingestellt.

Das gewonnene Chlorophyll a wurde spektroskopisch durch die Aufnahme von Absorptionsspektren auf seine Reinheit untersucht. Außerdem wurde das Absorptionsspektrum für den Infrarot-Bereich zwischen 1 und 15 μ aufgenommen. Bei einer Konzentration von 750 γ Chlorophyll a auf 1 g KBr (Makropreßling) stimmte das Spektrum weitgehend mit dem von STOLL und WIEDEMANN (1959) publizierten überein (vgl. auch METZNER und STRUSS 1963).

Alle Untersuchungen wurden im Dämmerlicht und möglichst unter Luftabschluß durchgeführt.

Das gewonnene Chlorophyll a wurde bei -18°C in Petroläther unter Stickstoff aufbewahrt. Die Verarbeitung erfolgte nach Möglichkeit sofort. War die Chlorophyll a-Lösung jedoch schon einige Tage alt, so wurde sie vor jedem Versuchsbeginn auf eventuell gebildete Abbauprodukte untersucht. Dabei zeigte sich, daß bei der oben beschriebenen Lagerung erst nach ca. einer Woche mit der Bildung von Phäophytin a gerechnet werden muß.

c) Benutzte Meßgeräte: Für die spektroskopischen Messungen standen folgende Geräte zur Verfügung:

Das Spektralphotometer PMQ II der Fa. ZEISS, Oberkochen, mit Doppelmonochromator MM 12 (Glasoptik) und Xenonhochdrucklampe XBO 450 W mit vorgeschalteter Filterküvette. Dieses Gerät diente lediglich dazu, Absorptionsspektren reinen Chlorophylls in verschiedenen Lösungsmitteln (in 1 cm-Küvetten) zu messen.

Die Chlorophyll-Träger-Komplexe wurden mit Hilfe einer Photometerkugel, dem zum PMQ II passenden Remissionsansatz RA 3, vermessen. Die Proben befanden sich dabei im Meßraum einer Durchflußküvette (METZNER 1966), die auf eine Schichtdicke von 1 mm eingestellt worden war. Da die zu untersuchenden Lösungen kein Sedimentieren befürchten ließen, wurde die Reflexion der ruhenden Flüssigkeit gemessen, nachdem die Reflexion der Küvette selbst mit einem Standard (ZEISS) geeicht worden war.

Um mit möglichst kleinen Spaltbreiten am Monochromator arbeiten zu können, muß erstens eine starke Lichtquelle verwendet, zweitens die größtmögliche Verstärkung am Anzeigegerät (10 · 10 · 3) gewählt werden. Der Spalt muß so klein gehalten werden, daß Messungen in einem Abstand von je 1 nm im Rotbereich sinnvoll sind, d.h. daß möglichst große Auflösungen und kleine effektive Bandbreiten erzielt werden. Bei dieser Anordnung sind Verfälschungen der Meßergebnisse durch Schwankungen der Netzspannung und damit der Lampenhelligkeit nur durch Mittelwertbildungen aus mehreren Ablesungen je Meßpunkt auszuschalten. Dadurch zieht sich die Aufnahme eines Spektrums über mehrere Stunden hin. Eine Korrektur der Meßwerte nach der von KUBELKA und MUNK (1931) angegebenen Funktion wurde anfänglich versucht. Diese Korrekturwerte beziehen sich jedoch auf Proben

mit unendlicher Schichtdicke; für eine Messung in dünnen Suspensionen sind sie nicht ohne weiteres zu übernehmen.

Als zu einem späteren Zeitpunkt ein schreibendes Spektralphotometer (ZEISS RPQ 20 A) zur Verfügung stand, wurden alle Messungen mit diesem Gerät wiederholt. Dieses Zweistrahlgerät mit Glühlampe 6 V 30 W ist eine Sonderausführung: die standardmässige Prismenoptik war durch ein Gitter ersetzt worden, außerdem wurde der übliche Vervielfacher (RCA-1P28) durch den Typ R 213 ausgetauscht. Dadurch wurde die langwellige Grenze des Rotbereichs bis etwa 750 nm verschoben. Durch die Verwendung des Gittermonochromators wurde eine hohe Registrierdispersion erreicht. Das Spektrum wird linear geschrieben und erlaubt so eine genaue Bestimmung der im langwelligen Teil liegenden Maxima. Allerdings ist durch diesen Umbau eine Aufnahme des sichtbaren Bereiches nur bis λ = 400 nm möglich. Gemessen wurde (in Durchsicht) in Küvetten mit einer Schichtdicke von 0,5 cm. Da die Küvette zweimal vom Lichtstrahl durchmessen wird, beträgt die effektive Schichtbreite jedoch 1 cm. Die (sehr geringe) Trübung der Chlorophyll a-Träger-Komplexe, hervorgerufen durch das leichte Schäumen beim Einbringen des Materials in die Küvette, wurde durch den Vergleich mit einer reinen Trägerlösung, die genau so schwach schäumte, eliminiert.

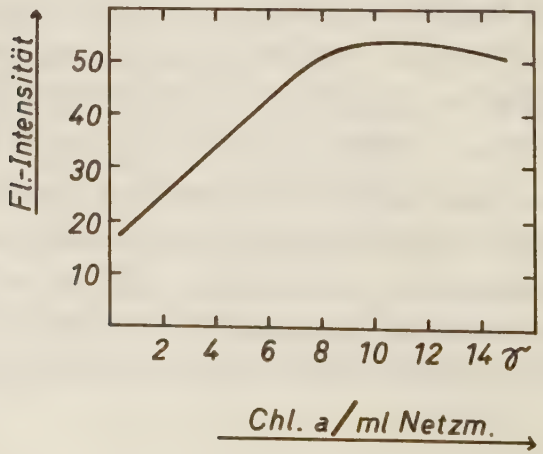
Die Fluoreszenzmessungen erfolgten im Spektralfluorometer ZMF 4C der Fa. ZEISS, Oberkochen, mit Xenonhochdrucklampe XBO 450 W. Das Erregerlicht, hier immer λ = 430 nm, traf senkrecht auf die Küvetten auf. Gemessen wird das durch den Küvettenboden ausstrahlende Fluoreszenzlicht, wobei die Lichtaus-

beute durch einen spiegelnden Küvettendeckel verstärkt wird.

Die Proben wurden gegen eine Lösung halber Konzentration als "Standard" gemessen. Durch dieses Verfahren werden die Schwankungen der Lichtquelle ausgeglichen, dagegen ist noch eine weitere Korrektur erforderlich, welche die Spektralabhängigkeit der Empfängerempfindlichkeit berücksichtigt (s.u.). Die Fluoreszenzrate nimmt nur bei verhältnismäßig geringen Konzentrationen linear mit der Substanzmenge zu; später tritt durch teilweise Reabsorption des Fluoreszenzlichts eine Abflachung ein (s. Abb. 1). In der vorliegenden Arbeit wurde ein Konzentrationsbereich gewählt, in dem ein linearer Zusammenhang garantiert werden kann.

Die IR-Spektren wurden mit dem Spektralphotometer der Fa. Ernst LEITZ, Wetzlar, aufgenommen.

Abb. 1: Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Chlorophyllkonzentration.



d) Chemie der Trägersubstanzen: Zur Herstellung der Chlorophyll-Komplexe sollten organische Trägersubstanzen verwendet werden. Zunächst angestellte Versuche mit Laurylpyridiniumchlorid verliefen unbefriedigend, da von diesem Träger nur wenig Chlorophyll adsorbiert wurde. Versuche mit Serumalbumin aus Rinderblut wurden ebenfalls bald aufgegeben, da das Aufbringen von Chlorophyll auf das in wässriger Lösung vorliegende Protein schwer zu standardisieren ist. Von der BASF / Ludwigshafen wurden schließlich elf verschiedene Netzmittel zur Verfügung gestellt, von denen sich drei nach eingehender Prüfung als geeignet erwiesen.

Als Träger dienten demnach Substanzen, deren Moleküle aus einem hydrophoben und einem hydrophilen Teil bestehen. In wässriger Lösung sind die hydrophilen Gruppen dem Wasser, die hydrophoben dem nichtwässrigen Medium zugewandt. Die intermolekularen Kräfte zwischen den hydrophoben Teilen bewirken zudem eine Parallellagerung der Moleküle. In genügend konzentrierter Lösung kommt es schließlich zur Ausbildung regelmäßiger Aggregate aus Molekülschichten: sogenannten Mizellen (vgl. SCHNEIDER 1964).

Man unterscheidet ganz allgemein zwischen anionischen, kationischen und nichtionischen Netzmitteln oder Emulgatoren. Die drei hier verwendeten Substanzen gehörten zum letztgenannten Typ, den elektroneutralen Emulgatoren. Sie wurden gebildet durch Anlagerung von ca. 10 Molekülen Äthylenoxyd an

1. Paranonylphenol Werksbezeichnung NEKANIL 910
2. einen C -C -Fettalkohol " NEKANIL C HOCHKONZ.
3. Ölsäuremonoäthanolamid " NEKANIL W EXTRA

(Angaben entsprechend den BASF-Firmenschriften).

Die hydrophilen Komponenten der Verbindungen sind die Polyäthergruppen. Ihr hydrophiler Charakter soll darauf beruhen, daß die Äthersauerstoffe die Eigenschaft haben, Wasser in oxoniumartiger Bindung anzulagern (HOUBEN-WEYL 1961, 1963). Die von solchen Verbindungen gebildeten Netzwerke sind außerordentlich stabil; sie können sogar vielfach eingefroren und wieder aufgetaut werden, ohne daß eine Koagulation eintritt. Außerdem sind Verbindungen dieses Typs unempfindlich gegen Härtebildner und Schwankungen des pH-Wertes.

Die Ausbildung von Mizellen sowie deren Größe und Form war für die Anlagerung von Chlorophyll von einiger Bedeutung. In letzter Zeit wurden zwar die Eigenschaften von einigen äthylenoxydhaltigen Verbindungen genauer untersucht, jedoch erwiesen sich die Untersuchungsmethoden als zu kompliziert, um in einem nicht speziell dafür ausgerüsteten Labor zur Anwendung zu kommen. Alle Angaben über die mögliche Gestalt der Mizellen beruhen daher auf Literaturwerten (SCHICK 1967).

Genauere Daten über die Größe der gebildeten Mizellen von den hier verwendeten Netzmitteln waren nur vom NEKANIL 910 erhältlich: bei 10 Molekülen Äthylenoxyd beträgt das Gewicht der Mizelle nach BECHER (1967) ca. 182000, wobei 276 monomere Einheiten bei 25°C eine Mizelle bilden. Die nach den vorliegenden Angaben berechneten Molekulargewichte betrugen für ein Monomeres

von NEKANIL 910	ca. 550
von NEKANIL C HOCHKONZ.	ca. 650
von NEKANIL W EXTRA	ca. 700

Da die Molekulargewichte der beiden anderen NEKANIL-Präparate ebenfalls in der Größenordnung des MG von NEKANIL 910 liegen, kann für sie wohl bei gleicher Molarität eine ähnliche Größe und Struktur der Mizelle angenommen werden, d.h. ein maximales MG von 200000 sowie Kugel-, eventuell Ellipsoidform (vgl. BECHER 1967).

Wird zu einer $1 \cdot 10^{-4}$ molaren NEKANIL 910-Lösung eine $1{,}1 \cdot 10^{-4}$ molare Chlorophyll a-Lösung gegeben, scheinen die Netzmittelmizellen nach den Absorptionsspektren zu urteilen, völlig mit dem Chlorophyll besetzt zu sein. Ein geringerer Anteil von Chlorophyllmolekülen findet bei diesem molaren Verhältnis keine Anheftungsstellen mehr auf den Mizellen vor und lagert sich frei in dem wässrigen Lösungsmittel zu Aggregaten zusammen (s.u.).

Die Herstellung eines Komplexes erfolgte durch Zugeben einer gewünschten Chlorophyll a-Menge (Lösung in Petroläther) zu den in bidestilliertem Wasser gelösten Netzmitteln. Der Petroläther konnte darauf am Rotationsverdampfer abgezogen werden. Das beginnende Aufschäumen des Netzmittels zeigte, daß der Petroläther entfernt war. Das Chlorophyll a war in die Netzmittelphase gegangen, die je nach Chlorophyllgehalt mehr oder weniger tief blau-grün gefärbt war.

B. Ergebnisse

a) Aufnahme von Absorptionsspektren: Als erstes wurden die spektroskopischen Daten der Chlorophyll-Träger-Komplexe untersucht. Um zu prüfen, ob die verwendeten Netzmittel im Absorp-

tionsbereich des Chlorophyll a eine Eigenabsorption aufweisen, wurden im registrierenden Spektralphotometer RPQ 20 A die Absorptionsspektren der drei Substanzen aufgenommen.

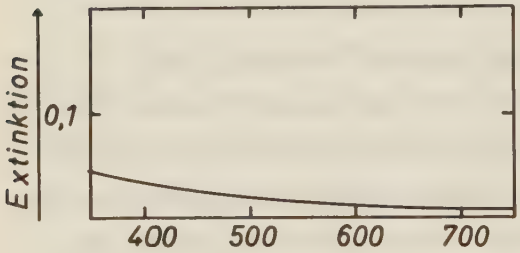


Abb. 2: Absorptionsspektrum des NEKANIL 910

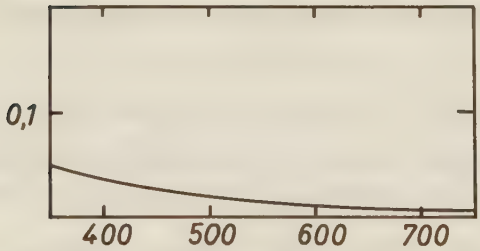


Abb. 3: Absorptionsspektrum des NEKANIL C HOCHKONZ.

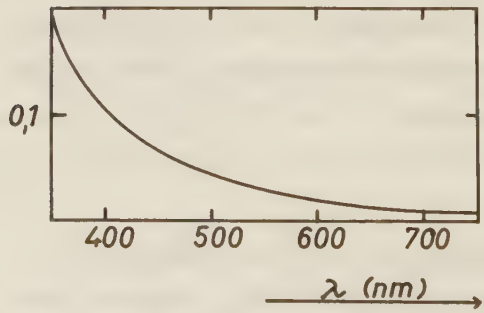


Abb. 4: Absorptionsspektrum des NEKANIL W EXTRA

Wie zu ersehen, liegen die Absorptionsmaxima aller drei NEKANILE unterhalb 400 nm und stören demnach nicht die Messungen im sichtbaren Bereich.

Nun war festzustellen, wieviel Chlorophyll a maximal von einer bestimmten Netzmittelmenge angelagert werden kann. Dazu wurde eine gleichbleibende Menge Chlorophyll a, nämlich 10 γ/ml Netzmittel zu verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen Trägers zugegeben und der Komplex spektralphotometrisch vermessen. Für die Verdünnungsreihen wurden folgende Netzmittelkonzentrationen untersucht:

I NEKANIL 910

A $1 \cdot 10^{-2}$ mol

B $1 \cdot 10^{-3}$ mol

C $1 \cdot 10^{-4}$ mol

D $1 \cdot 10^{-5}$ mol

Die Lösungen mit den Konzentrationen A und B zeigen ein eingipfliges Spektrum mit einem Absorptionsmaximum bei 668 nm, während bei Konzentration C eine Abnahme der Extinktion bei dieser Wellenlänge zu beobachten war, verbunden mit einem leichten Anstieg der Extinktion bei 745 nm. Bei Konzentration D hatte die Extinktion bei 668 nm noch weiter abgenommen, dafür trat bei ca. 745 nm ein zweites, schwaches Maximum auf (siehe Abb.5). Eine ähnliche Verdünnungsreihe wurde für das Netzmittel II NEKANIL C HOCHKONZENTRIERT untersucht.

Abb. 5: Absorptionsspektrum von NEKANIL 910

A $1 \cdot 10^{-2}$ mol C $1 \cdot 10^{-4}$ mol

B $1 \cdot 10^{-3}$ mol D $1 \cdot 10^{-5}$ mol

plus je 10 γ Chlorophyll a

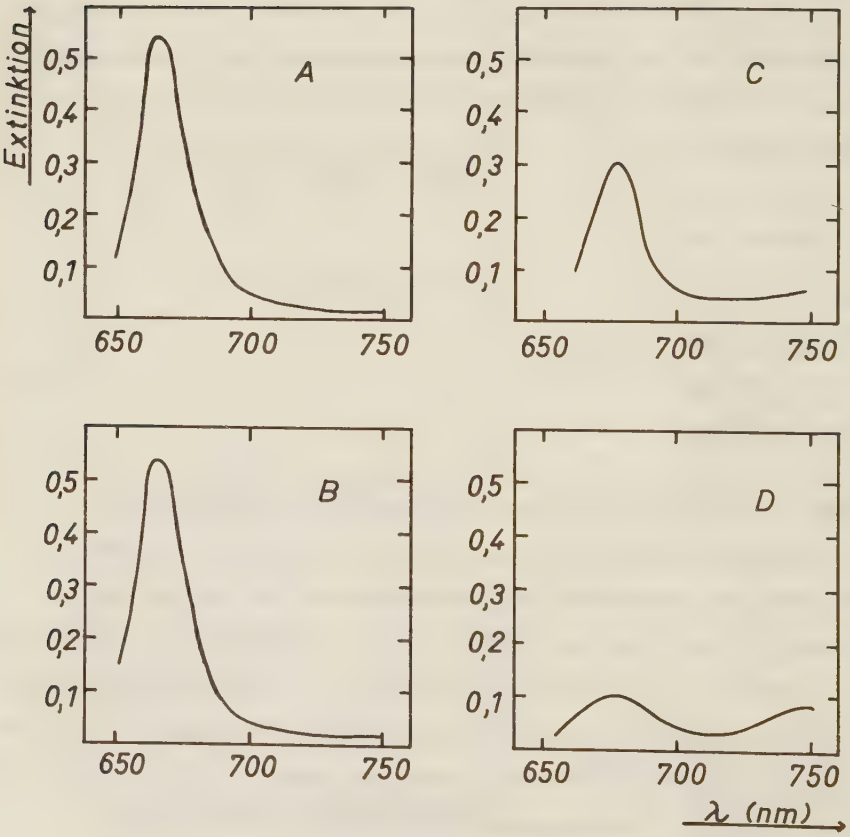
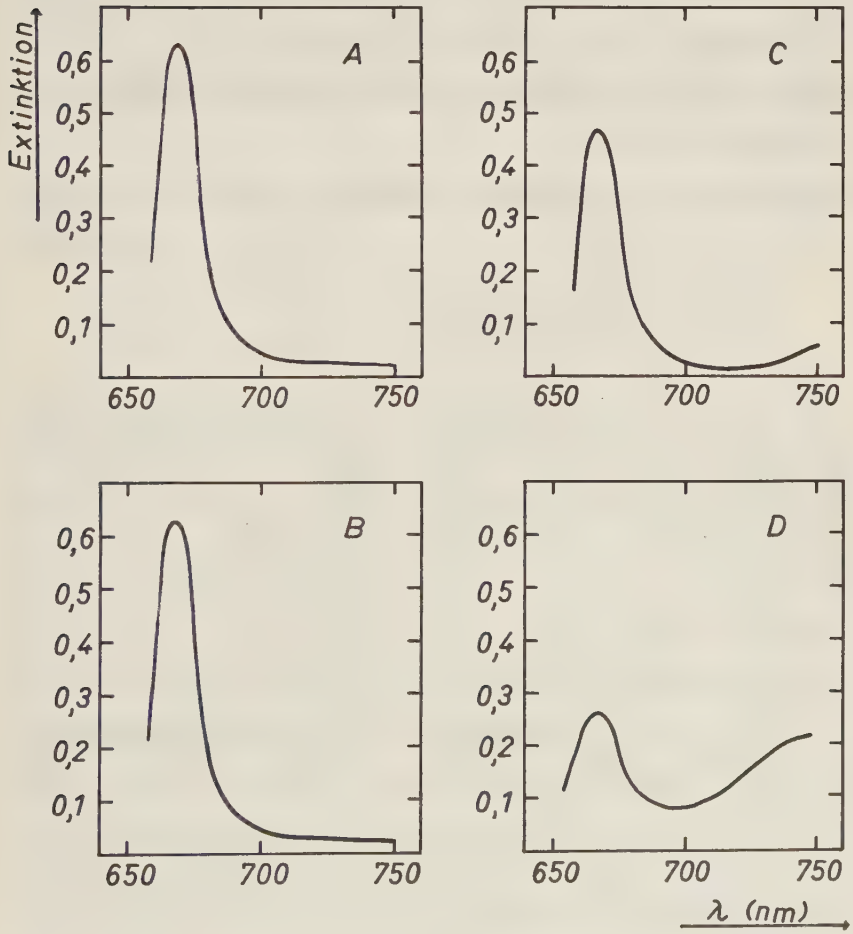


Abb. 6: Absorptionsspektrum des NEKANIL C HOCHKONZ.

A $1 \cdot 10^{-1}$ mol C $1 \cdot 10^{-3}$ mol

B $1 \cdot 10^{-2}$ mol D $1 \cdot 10^{-4}$ mol

plus je 10 γ Chlorophyll a



A $1 \cdot 10^{-1}$ mol C $1 \cdot 10^{-3}$ mol

B $1 \cdot 10^{-2}$ mol D $1 \cdot 10^{-4}$ mol

Wieder zeigte sich bei den Konzentrationen A und B ein eingipfliges Spektrum mit einem Absorptionsmaximum bei 668 nm; die Konzentrationen C und D verhielten sich ebenfalls wie die entsprechenden Konzentrationen bei NEKANIL 910, jedoch war die Sättigungsgrenze schon früher erreicht (s. Abb. 6).

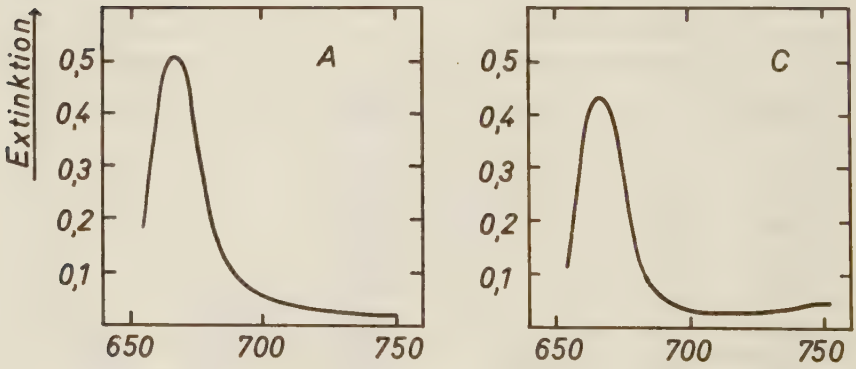
Ganz ähnliche Ergebnisse zeigte die Konzentrationsreihe von III NEKANIL W EXTRA

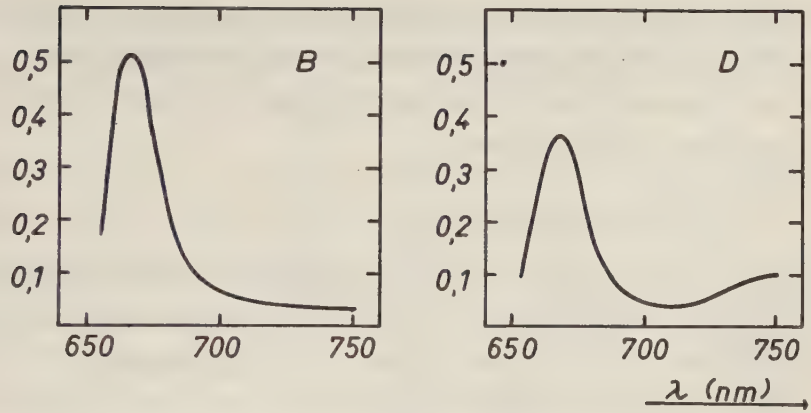
Abb. 7: Absorptionsspektrum von NEKANIL W EXTRA

A $1 \cdot 10^{-1}$ mol C $1 \cdot 10^{-3}$ mol

B $1 \cdot 10^{-2}$ mol D $1 \cdot 10^{-4}$ mol

plus je 10 γ Chlorophyll a





Die gewählten Konzentrationen entsprachen denen von NEKANIL C HOCHKONZ.:

A	$1 \cdot 10^{-1}$ mol	C	$1 \cdot 10^{-3}$ mol
B	$1 \cdot 10^{-2}$ mol	D	$1 \cdot 10^{-4}$ mol

Die Kurvenbilder ähneln den bereits oben gezeigten: Bei Konzentration A und B trat nur ein Absorptionsmaximum bei 668 nm auf, bei C war bereits eine Extinktionszunahme bei 745 nm zu beobachten, und bei Konzentration D zeigte sich ein zweites Maximum bei 745 nm (s. Abb. 7).

Zum Vergleich wurde das Absorptionsspektrum einer $1{,}1 \cdot 10^{-4}$molaren Chlorophyll a-Lösung in Petroläther aufgenommen. Das Absorptionsmaximum lag hier bei 660 nm.

Ein Absorptionsmaximum bei 745 nm für Chlorophyll a ist bisher nur für kristallines Chlorophyll sowie für Polymere beschrieben worden (CALVIN: 748 nm; VERNON: 745 nm). Es wurde deshalb angenommen, daß nicht mehr adsorbiertes Chlorophyll a in dem wässrigen Medium zu Aggregaten zusammentritt und so eine Ab-

sorption bei 745 nm zeigt. Das setzt voraus, daß die Netzmittelmizellen eine maximale Chlorophyllmenge angelagert haben und bei Erreichen des Sättigungsgrades kein "freies" Netzmittel mehr zur Verfügung steht.

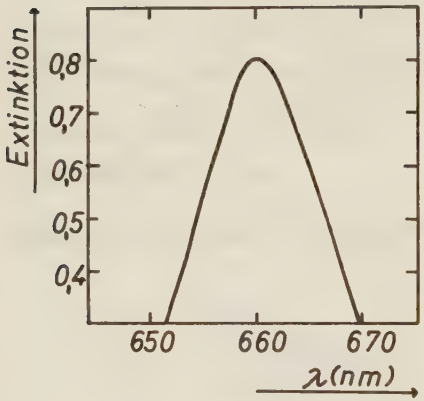


Abb. 8: Absorptionsspektrum von Chlorophyll a in Petroläther

Für die folgenden Versuche wurde daher eine Konzentration gewählt, bei der alles zugegebene Chlorophyll a als angelagert, wenigstens aber als ausgerichtet zwischen den Netzmittelmolekülen, angesehen werden kann, nämlich eine $1 \cdot 10^{-2}$molare Netzmittellösung plus 10 γ Chlorophyll a/ml Netzmittel.

b) Beständigkeit der Komplexe: Chlorophyll a zeigt in Lösung gegenüber dem in einer lebenden Zelle vorhandenen Pigment sehr schnell Zerfallserscheinungen. Besonders empfindlich ist es gegen Lichteinwirkung und Sauerstoffzutritt. Es war deshalb zu prüfen, ob an Trägersubstanzen adsorbiertes Chlorophyll a eine höhere Beständigkeit als gelöstes Chlorophyll a aufweist. Die

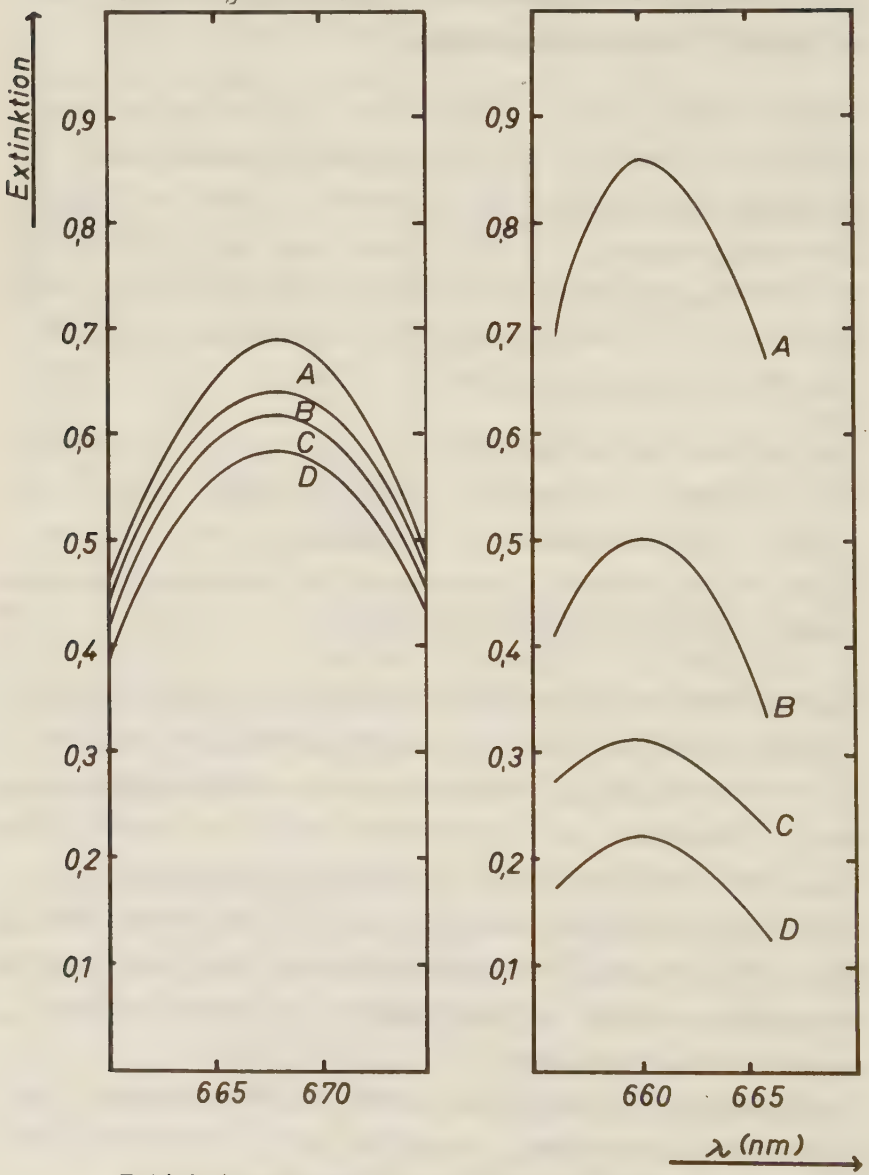
Chlorophyll-Träger-Komplexe wurden daher unter verschiedensten Bedingungen gelagert und die Absorptionsspektren in regelmäßigen Abständen aufgenommen.

Zunächst wurde je eine $1 \cdot 10^{-2}$molare, 10 γ Chlorophyll a/ml enthaltende Lösung der drei NEKANILE bei Zimmertemperatur unter einer Lampe (OSRAM 75 W) aufbewahrt, zusammen mit einer Kontrolle von einer $1{,}1 \cdot 10^{-4}$molaren Chlorophyll-a-Lösung in Petroläther. Vor Beginn der Bestrahlung und nachfolgend in Abständen von drei Stunden wurden die Absorptionsspektren mit dem RPQ 20 A gemessen (s. Abb. 9, 10 und 11).

Die Lage der Absorptionsmaxima blieb konstant, die Extinktion der Chlorophyll a-Lösung nahm rascher ab als die der drei Chlorophyll a-Träger-Komplexe. Die Beständigkeit ist jedoch von Netzmittel zu Netzmittel verschieden; die geringste Extinktionsabnahme zeigte der NEKANIL 910-Komplex.

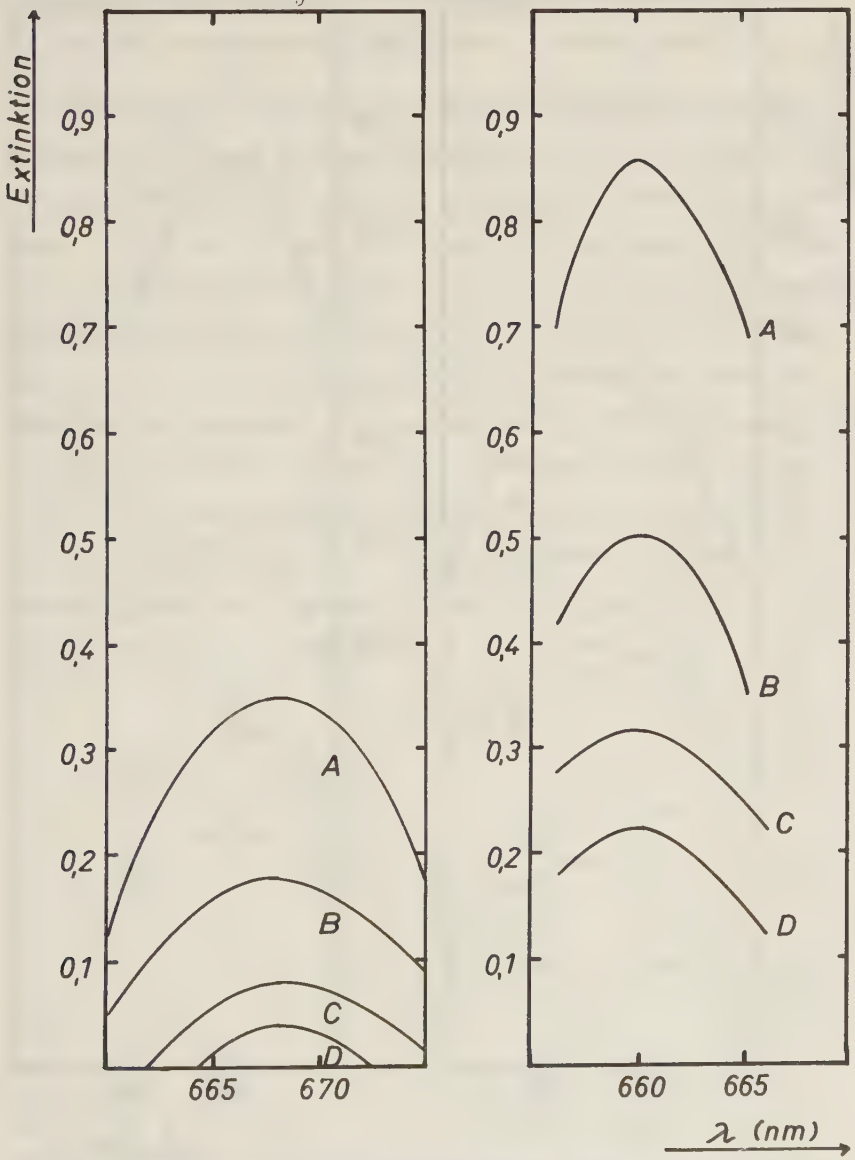
In einer weiteren Versuchsserie wurden die verschiedenen Chlorophyll a-Träger-Komplexe in gleicher Molarität wie bei den Lichtversuchen (s.o.) zusammen mit einer entsprechenden Kontrolle (Chlorophyll a, in Petroläther gelöst) im Dunkeln gehalten. Dabei wurde jeweils ein Probenpaar der Temperatur von $+20^{\circ}C$, ein zweites der Temperatur von $+7^{\circ}C$ ausgesetzt. Nach Ablauf von 20, 46 und 238 Stunden wurden die Absorptionsspektren geschrieben, nachdem zu Versuchsbeginn ein Kontrollspektrum aufgezeichnet worden war.
Die Extinktion der molekularen Lösung des Pigments nahm - wie nicht anders zu erwarten - von Anfang an ab. Ganz entsprechend

Abb. 9: Extinktionsabnahme des NEKANIL 910-Komplexes plus 10 % Chlorophyll a bei Belichtung (links)



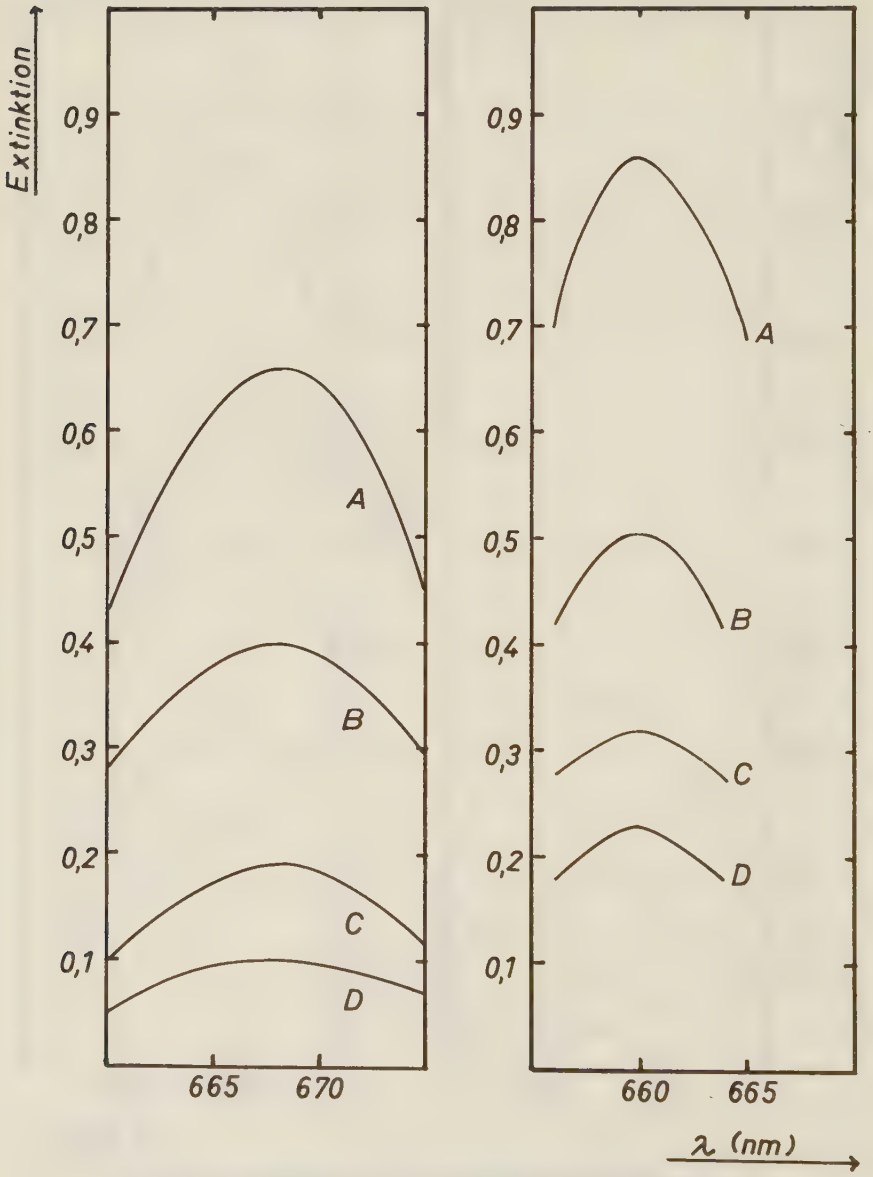
Extinktionsabnahme einer Chlorophyll-Petroläther-Lösung bei Belichtung (rechts)

Abb. 10: Extinktionsabnahme eines NEKANIL C HOCHKONZ.-Komplexes plus 10 γ Chlorophyll a bei Belichtung (links)



Extinktionsabnahme einer Chlorophyll a-Petroläther-Lösung bei Belichtung (rechts)

Abb. 11: Extinktionsabnahme eines NEKANIL W EXTRA-Komplexes bei Belichtung (links)

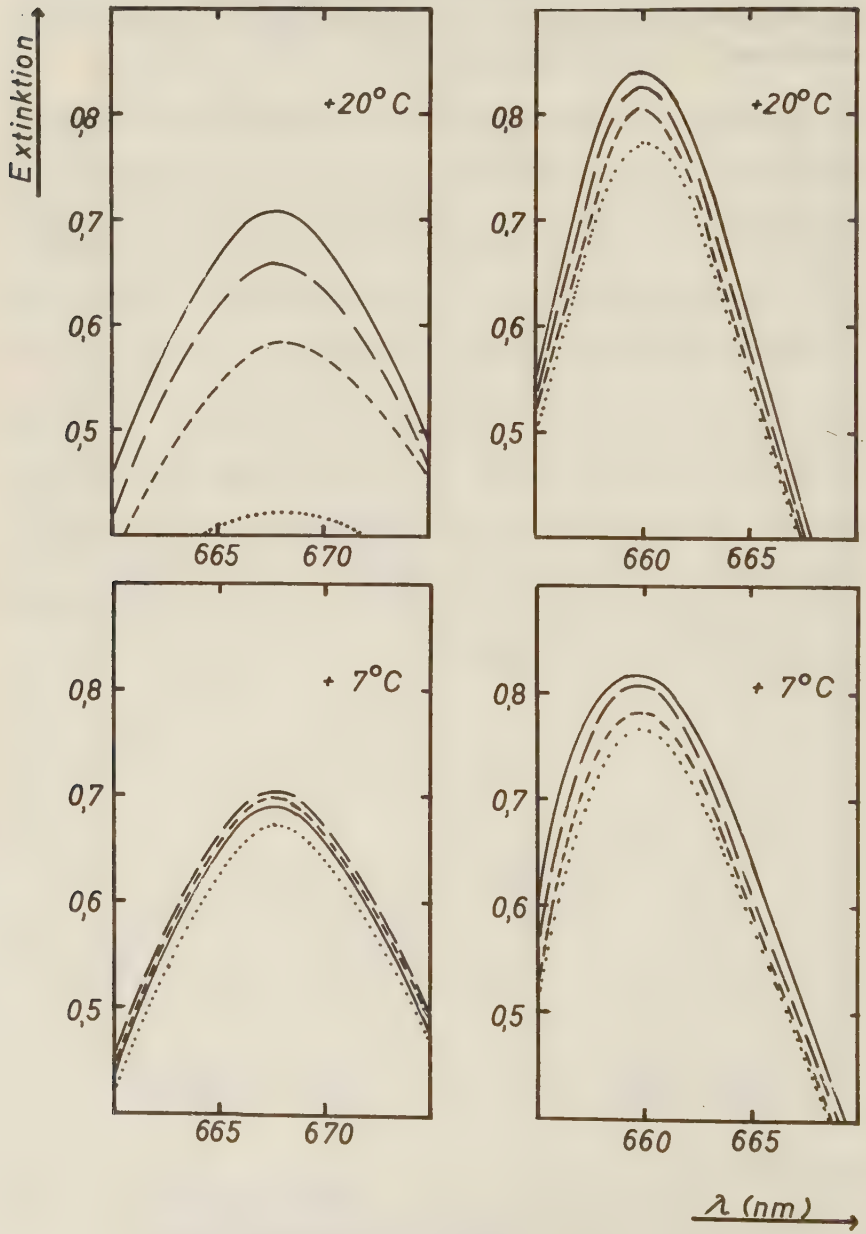


Extinktionsabnahme einer Chlorophyll a-Petroläther-Lösung bei Belichtung (rechts)

verhielt sich der NEKANIL 910-Komplex (bei +20°C). Alle anderen Proben zeigten zunächst eine Extinktionszunahme, der erst nach Ablauf verschiedener Zeiten eine Abnahme folgte.

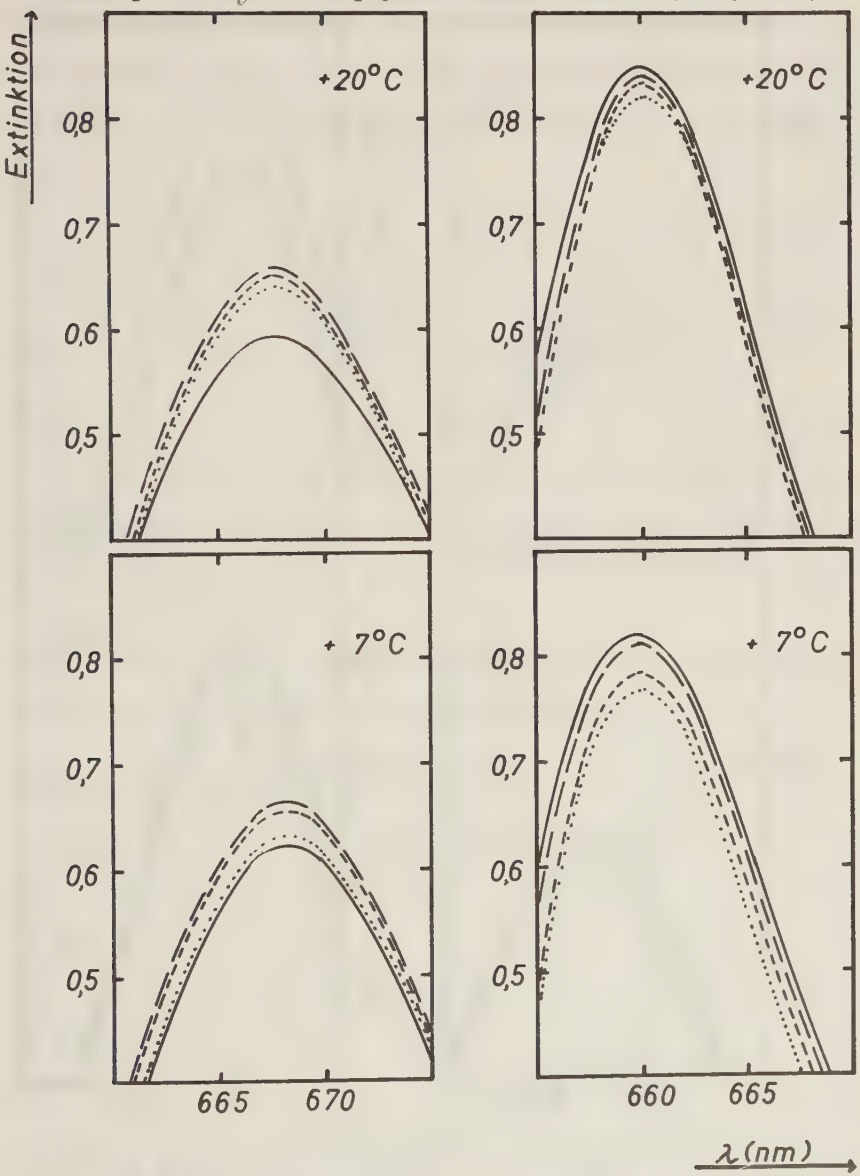
Zur nochmaligen Überprüfung der Absorptionsspektren wurden die Messungen mit einem Spektralphotometer PMQ II mit Doppelmonochromator MM 12 wiederholt; als Lichtquelle diente eine Glühlampe (6 V 30 W). Da das Gerät aus einem separaten Stromkreis hoher Spannungskonstanz gespeist wurde, waren die Schwankungen des Anzeigeinstruments sehr viel geringer als bei den früheren Meßreihen. Bei einer zehnmaligen Wiederholung der Ablesungen streuten die einzelnen Daten nur um etwa $\pm$ 2 %. Das Absorptionsmaximum lag wiederum bei 668 nm; es erwies sich auch in dieser Meßreihe als eingipflig. Da die Spaltbreiten des Monochromators zwischen 0,02 und 0,04 mm gehalten werden konnten, ist eine Verschleierung von Nebenmaxima bzw. Schultern infolge zu geringer Auflösung nicht anzunehmen.

Abb. 12: Aufnahme von Absorptionsspektren von NEKANIL 910 plus 10 γ Chlorophyll a bei +20°C und +7°C (links)



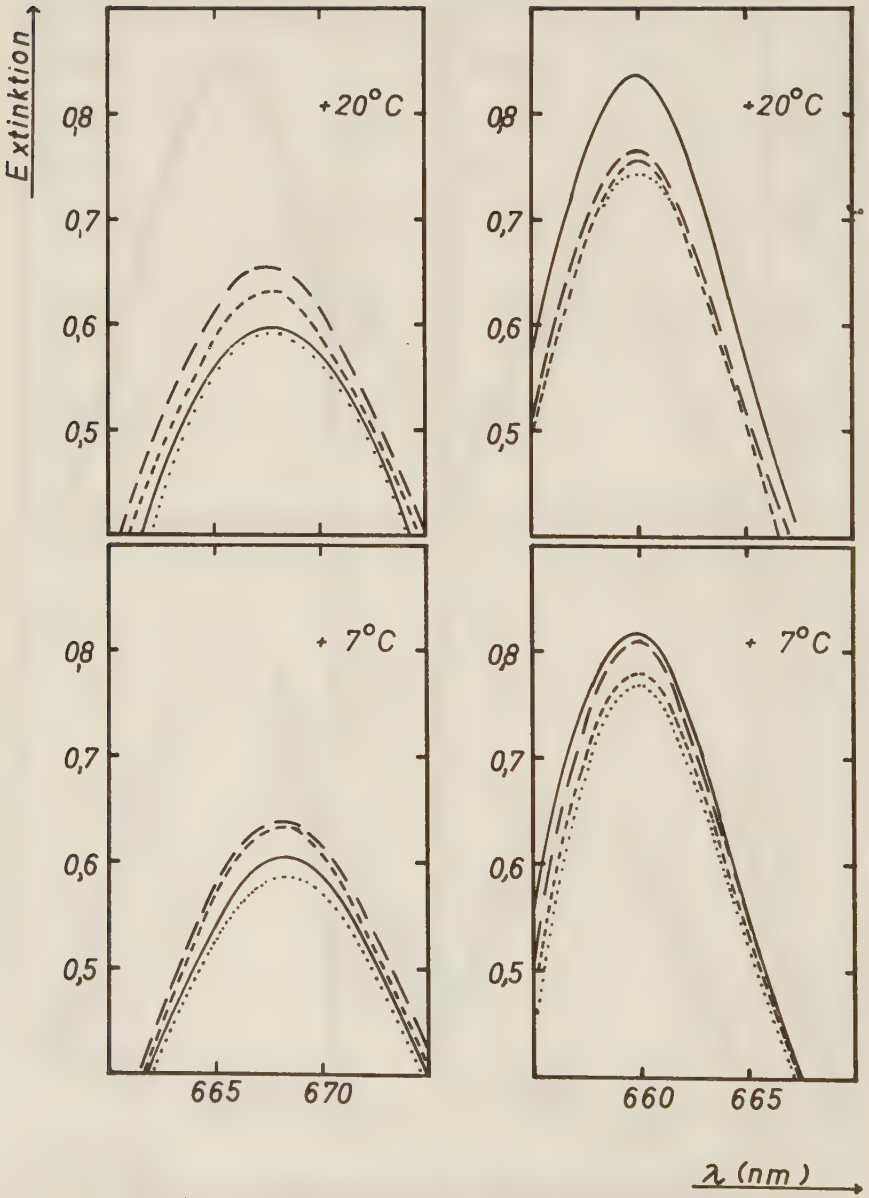
Extinktionsannahme einer Chlorophyll a-Lösung in Petroläther bei +20°C und +7°C (rechts) (Im Dunkeln gehalten)

Abb. 13: Absorptionsspektren von NEKANIL C HOCHKONZ. plus 10 % Chlorophyll a bei +20°C und +7°C (links)



Extinktionsabnahme einer Chlorophyll a-Lösung in Petroläther bei +20°C und 7°C (rechts) (Im Dunkeln gehalten)

Abb. 14: Absorptionsspektren von NEKANIL W EXTRA plus 10 γ Chlorophyll a bei +20°C und +7°C (links)



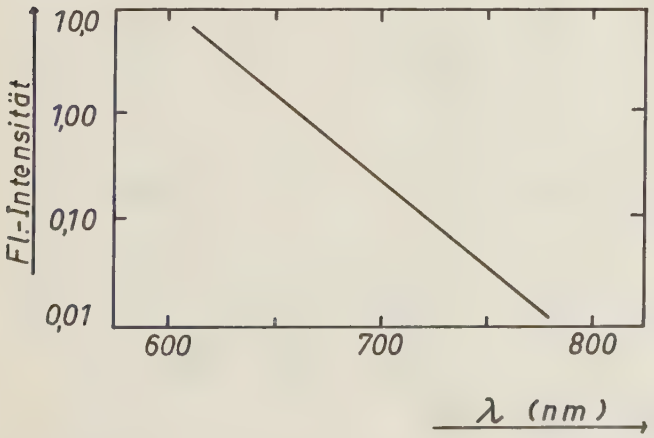
Extinktionsabnahme einer Chlorophyll a-Lösung in Petroläther bei +20°C und +7°C (rechts) (Im Dunkeln gehalten)

c) Fluoreszenzspektren der Chlorophyll a-Träger-Komplexe:

Zur Ergänzung der Absorptionsspektren wurden nach der oben beschriebenen Methode (s. S. 34 und 35) mit dem ZEISS-Spektralfluorometer die Fluoreszenzspektren aufgenommen. Alle Messungen erfolgten bei Zimmertemperatur.

Die am Anzeigegerät abgelesenen Werte stellen das Produkt aus spektraler Energieverteilung des Fluoreszenzlichtes, Durchlässigkeit der Optik, reziproker linearer Dispersion der Optik und spektraler Empfindlichkeit des Empfängers dar (REULE).
Wenn auch durch den Bezug auf einen Standard (s. S. 14) die Lampenschwankungen eliminiert werden, so ist es doch unumgänglich, die erhaltenen Werte wenigstens gegen die spektrale Empfindlichkeit des Photomultipliers zu korrigieren, zumal dieser gerade im Rotbereich des Spektrums die Grenze seiner Leistungsfähigkeit erreicht.
Die hier angegebenen Daten sind sämtlich gegen die relative spektrale Empfindlichkeit des Vervielfachers (RCA - 1P 28) im

Abb. 15: Relative spektrale Empfindlichkeit des RCA - 1P 28 Photomultipliers



verwendeten Gerät korrigiert. Die Korrekturwerte wurden vom Hersteller zur Verfügung gestellt. Zur Aufnahme der Fluoreszenzspektren wurden auf die in 10 ml der 0,01molaren Netzmittellösungen enthaltenen Mizellen je 5 γ Chlorophyll a/ml aufgebracht. Eine Zugabe von 10 γ entsprechend der Chlorophyll a-Konzentration bei den Absorptionsspektren war nicht möglich, da der lineare Anstiegsbereich der Fluoreszenzintensität bei dieser Konzentration bereits überschritten war (s. Abb. 1).

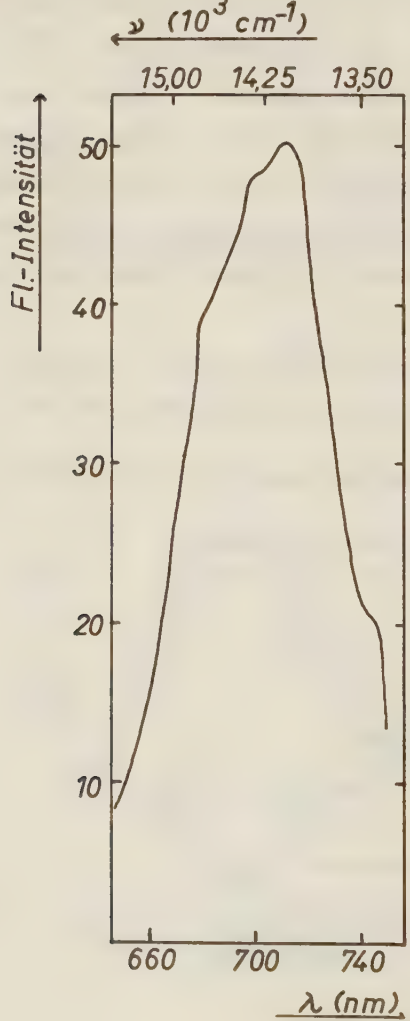
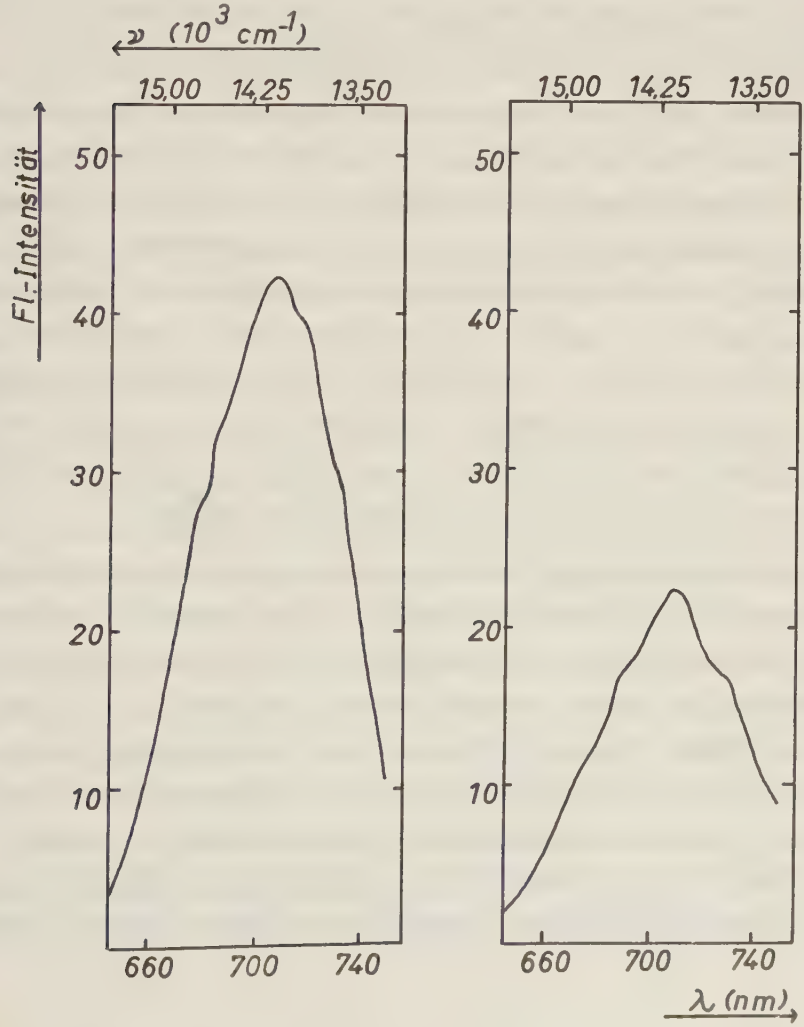


Abb. 16: Emissionsspektrum eines 0,01molaren NEKANIL 910-Komplexes plus 5 Chlorophyll a/ml Netzmittel. Err. 430 nm, korrigiert.

Das Fluoreszenzspektrum des NEKANIL 910-Komplexes zeigt ein Maximum bei 715 nm und drei Schultern: 684, 700 und 745 nm.

Abb. 17: Emissionsspektrum eines NEKANIL C HOCHKONZ.-Komplexes plus 5 γ Chlorophyll a. Err. 430 nm, korrigiert

Abb. 18: Emissionsspektrum eines NEKANIL W EXTRA-Komplexes plus 5 γ Chlorophyll a. Err. 430 nm, korrig.



Die Emissionsspektren der NEKANIL C HOCHKONZ.- und NEKANIL W EXTRA-Komplexe weichen davon ab: beide zeigen zwei Gipfel bei 710 nm und 730 nm, aber nur sehr kleine Schultern bei 678 nm und 688 resp. 684 nm (s. Abb. 16, 17 und 18).

d) Photochemische Wirksamkeit der Komplexe: Im Anschluß an die spektroskopischen Untersuchungen wurden die photochemischen Eigenschaften des Chlorophyll-NEKANIL-Komplexes studiert.

Zunächst wurde untersucht, ob bzw. inwieweit der chlorophyllhaltige NEKANIL 910-Komplex in der Lage ist, bei Belichtung in wässrigen Lösungen noch Farbstoffe zu reduzieren. Als Elektronenacceptor wurde dabei das Dichlorphenolindophenol (DCPIP) benutzt, dessen Redoxpotential E_0' bei +0,242 V liegt (vgl. RAUEN). Bei neutraler Reaktion (pH 7,2) zeigte das mit dem Spektralphotometer RPQ 20 A registrierte Absorptionsspektrum der DCPIP-Lösung in 0,01 mol NEKANIL eine starke Verschiebung des Absorptionsmaximums von 604 nach 630 nm. Demnach wird der zugesetzte Farbstoff offenbar an die Seifenmizellen adsorbiert.

Bei der Wellenlänge λ = 630 nm wurden nun die lichtbedingten Extinktionsänderungen registriert. Dabei dienten die normalen Küvetten des Meßinstruments (Schichtdicke 0,5 mm) als Reaktionsgefäße; das Reaktionsgemisch bestand aus einer 0,01 mol Lösung des NEKANIL 910, der 30 γ Chlorophyll a/ml zugesetzt waren. Dazu kamen 0,02 ml einer 10^{-3}mol DCPIP-Lösung in Phosphatpuffer pH 7. Die Bestrahlung erfolgte über eine OSRAM E 27-Lampe (220 V 500 W) in ungefähr 20 cm Abstand von den Küvetten. Als Wärmeschutzfilter wurde eine mit einer 2%igen Orange G-Lösung

gefüllte Glasküvette eingesetzt, die zugleich den Hauptanteil kurzwelliger Strahlung schluckte (λ 600 nm).

Bei dieser Versuchsanordnung ließ sich in einer Lösung von DCPIP in reinem NEKANIL über 25 min hin keine Extinktionsänderung registrieren. Eine weitere Kontrollküvette enthielt zwar chlorophyllhaltiges NEKANIL, nicht aber DCPIP; auf diese Weise sollte eine eventuelle Lichtzerstörung des Chlorophylls festgestellt werden. Der Meßküvette dagegen wurde zusätzlich der Farbstoff als Elektronenacceptor zugesetzt. Dabei wurden die Küvetten, um Photooxydation auszuschließen, unter reinem Stickstoff gehalten. Wie Tab. 1 erkennen läßt, trat in diesen Versuchen eine sehr geringe Extinktionszunahme im Absorptionsmaximum des Farbstoffs ein, die möglicherweise nicht signifikant ist. Demnach tritt keine reine "Hill-Reaktion" mit Wasser als Elektronendonator ein.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde den Reaktionsmischungen ein Elektronendonator zugesetzt, dessen Potential sich weniger vom Redoxpotential des Acceptors unterscheidet. Als Donator wurde das Kaliumferrocyanid gewählt. Von diesem Salz wurden 0,02 ml einer 10^{-2}mol-Lösung zugegeben. Dabei wurde der Anteil des Acceptors auf 0,03 ml heraufgesetzt. Wiederum wurde ein Kontrollversuch vorgeschaltet, bei dem ein Gemisch von Dichlorphenolindophenol und Kaliumferrocyanid in reinem NEKANIL belichtet wurde. Weder in der Absorptionsbande des Eisenkomplexes noch in der des Farbstoffs ließ sich nach 25 min Belichtung eine signifikante Änderung ausmachen (Tab. 1). Wurde nun aber Chlorophyll an die Mizellen angelagert, so ergab sich eine sehr

deutliche Elektronenverschiebung (Tab. 1). Sie konnte über die Zunahme bei 420 nm (Absorptionsmaximum des entstandenen Kaliumferricyanids) sowie über die Extinktionsabnahme im Absorptionsmaximum des DCPIP bestimmt werden.

Kontrollversuche erweisen, daß auch kolloides Chlorophyll (gewonnen durch Zusatz von Wasser zu einer methanolischen Chlorophyllösung) einen gewissen Effekt hat, daß dagegen in Aceton gelöster Sensibilisator kaum noch wirksam ist.

NEKANIL 910 MIT ZUSATZ VON			EXTINKTIONS-ZUNAHME VON	EXTINKTIONS-ABNAHME VON
DCPIP	CHLOROPHYLL	FERROCYANID	FERRICYANID	DCPIP
+	-	+	2,9 %	-
+	+	-	-	1 %
+	+	+	18,2 %	7,1 %

Tabelle I: Photochemische Wirksamkeit des NEKANIL-Chlorophyll-Komplexes bei Zugabe von DCPIP und FERROCANID

III. DISKUSSION

Um ein möglichst einfaches Modellsystem der photosynthetischen Einheit herstellen zu können, sollte von reinem Chlorophyll a ausgegangen werden. Die Absorptionsspektren des durch Gegenstromverteilung aus dem Rohextrakt gewonnenen Chlorophyll a zeigten im Rotbereich folgendes Maximum:

662 nm in Petroläther
664 nm in Aceton, beide gemessen im PMQ II und
660 nm in Petroläther, gemessen im RPQ 20 A.

Ebenso ließen auch die aufgenommenen Spektren im IR-Bereich auf einen hohen Reinheitsgrad schließen. Von großer Wichtigkeit für die Charakterisierung des Modellsystems war das Zusammenwirken von Chlorophyll, Trägermaterial und Lösungsmittel, da der Einfluß einer dritten Komponente, in diesem Falle des Pigmentes, die Eigenschaften einer Netzmittelmizelle unter Umständen sehr verändern kann. Zwei Arten von Substanzen sind bisher untersucht (vgl. BECHER 1967)

1. Elektrolyte,
2. nichtionische polare Komponenten, die in die Mizelle eingebaut werden können. Bei einem Einbringen von Chlorophyll in eine wässrige Netzmittellösung muß sich der Dipolcharakter des Pigmentes auswirken.

Wahrscheinlich ist ein gerichteter Einbau des Chlorophyll a in die Netzmittelmizelle. Die Porphyrinringe des Moleküls können mit ihren Ester- und Ketogruppen mit den ebenfalls hydrophilen

Polyäthergruppen des Netzmittels verbunden sein, während die Phytolkette mit den hydrophoben, wahrscheinlich ins Mizelleninnere der Träger gerichteten Molekülgruppen in Verbindung stehen. Ein genauer Aufschluß über die Verbindung Chlorophyll-Netzmittel konnte in der zur Verfügung stehenden Zeit noch nicht erbracht werden.

Die bei allen Absorptionsmessungen festgestellte Verschiebung des Rotgipfels von 660 nm nach 668 nm = 8 nm gegenüber dem Chlorophyll a in Lösung liegt jedoch der bei lebenden Zellen festgestellten Verschiebung von 10 nm recht nahe.

Bei den Fluoreszenzspektren tritt diese Verschiebung noch deutlicher zutage: während für Chlorophyll a in Lösung ein Maximum bei 668 nm angegeben wird (vgl. GOEDHEER 1964), liegen bei den drei Chlorophyll a-Träger-Komplexen die Maxima für NEKANIL 910 bei 715 nm, für NEKANIL W EXTRA und C HOCHKONZ bei 710 nm. Das bedeutet eine Verschiebung um mehr als 40 nm. Ein Auftreten von Schultern in den Fluoreszenzspektren war um so überraschender, als die Absorptionsspektren nur ein Maximum aufweisen. Während bei den Absorptionsspektren der Chlorophyllkomplexe eine Ähnlichkeit mit in vivo-Spektren nicht zu finden ist, stimmen ihre Fluoreszenzspektren recht gut mit in vivo-Messungen von Porphyridium cruentum überein. Am deutlichsten zeigt das Fluoreszenzspektrum des NEKANIL 910-Komplexes diese Übereinstimmung. Da die Spektren des Trägermaterials im Rotbereich keine Absorption aufweisen, müssen für die Aufspaltung des Fluoreszenzspektrums andere Faktoren verantwortlich gemacht werden. Am wahrscheinlichsten ist die Annahme von mehreren, dem Chlorophyll a che-

misch so eng verwandten Chlorophyllarten, daß ihre Trennung nach der in Teil I beschriebenen Methode nicht möglich ist. Diese Deutung der Spektren würde übereinstimmen mit den Untersuchungen von GOEDHEER (1964), der bei Fluoreszenzspektren von ganzen Algen drei Banden fand:

686 nm, 696 nm und 717 nm. Eigene Messungen:
684 nm, 700 nm und 715 nm. Bei NEKANIL 910.

GOEDHEER ordnet diese Banden den in vivo-Absorptionsmaxima bei 670 nm, 680 nm und 695 nm zu. Bei den ersten beiden soll es sich um Chlorophyll a-Formen mit etwas unterschiedlicher Breite der Absorptionsmaxima handeln, die dritte Form ist nur selten sichtbar, da ihr Anteil am Chlorophyll a nur ca. 1 % betragen soll. Die Tatsache, daß gerade die in geringster Menge vorhandene Chlorophyll-Form die höchste Fluoreszenzintensität zeigt, läßt sich wohl mit der Energieübertragung von den Formen 686 und 696 zum 717 erklären. Sie beträgt jedoch nie 100 %, da sonst keine Fluoreszenz der beiden anderen Formen zu beobachten wäre. Daß in den Absorptionsspektren nur ein Maximum auftritt, könnte durch Überlappung der beiden Formen 670 und 680 zu erklären sein, so daß die Dispersion des RPQ 20 A nicht mehr zur Auflösung ausreichte. Die Konzentration des 717 ist für Absorptionsmessungen unter normalen Bedingungen ohnehin zu gering.

Die in allen drei gemessenen Fluoreszenzspektren auftretende Schulter bei 740 - 745 nm ist wahrscheinlich auf eine Aggregatbildung des Chlorophyll zurückzuführen, da vielleicht in Spuren vorhandenes, nicht gebundenes Chlorophyll im Absorptionsspektrum nicht mehr in Erscheinung tritt.

Im Gegensatz zu GOEDHEER führen BRODY und BRODY (1966) die verschiedenen Fluoreszenzbanden auf die Bildung von Dimeren und Polymeren zurück und schreiben die Bande bei 685 nm monomerem Chlorophyll zu; auch machen sie Veränderungen der Proteinträger für auftretende Intensitätsschwankungen verantwortlich.

SIRONVAL (1965) vermutet, daß die Lage der Rotbanden in vivo vom Grad der Veresterung des Chlorophyllmoleküls bestimmt wird, da die Bindung des Pigments an den Lipoproteinkomplex bei der Umwandlung von Chlorophyllid a (683 nm) zum Chlorophyll a (672 nm) verändert wird. Es wurden jedoch immer wieder von verschiedenen Autoren (vgl. BRODY, BRODY und LEVINE 1965, CEDERSTRAND, RABINOWITCH und GOVINDJEE 1966) Daten für Chloroplastenteilstücke angegeben, deren Fluoreszenzmaximum je nach Größe der Bruchstücke bei 680 nm oder 717 nm liegt; Ergebnisse, die eher auf einen natürlichen Chlorophyll-Träger-Komplex hindeuten.

Einen weiteren Aufschluß über die Beschaffenheit der untersuchten Modellsysteme gaben die Untersuchungen der Stabilität der Komplexe. Auch hier war das beste Ergebnis bei dem NEKANIL 910-Komplex festzustellen: er wies die größte Beständigkeit gegenüber dem Einfluß von Licht und Sauerstoff bei Zimmertemperatur auf. Dieser Befund deutet ebenfalls auf eine enge Verbindung von Chlorophyll und Trägermaterial hin. Auch KARJAGIN und CMUTINA (1966) stellten eine größere Lichtbeständigkeit ihres Polyamid-Chlorophyll-Komplexes fest. Etwas erstaunliche Ergebnisse zeigte dagegen die Prüfung der Haltbarkeit der Komplexe bei +20°C und +7°C im Dunkeln. Eine langsam beginnende Extinktionsabnahme der NEKANIL-Chlorophyll-Komplexe war zu erwarten,

die jedoch nur bei dem NEKANIL 910-Komplex bei +20°C eintrat.

Noch unerklärlich ist dagegen die bei allen anderen Proben erfolgende vorübergehende Extinktionszunahme, die besonders deutlich nach 20 Stunden zu beobachten war. Um einen Verdunstungseffekt kann es sich dabei nicht handeln, da die Extinktion der molekularen Chlorophyllösungen, die mit den Proben zusammen gelagert waren, von Versuchsbeginn an abnahm. Ein Verdungstungseffekt hätte sich bei diesen Chlorophyll-Petroläther-Kontrollen noch stärker bemerkbar machen müssen als bei den wässrigen NEKANIL-Chlorophyll-Komplexen. Denkbar wäre jedoch eine bei langer Lagerung eintretende Ablösung einiger Chlorophyllmoleküle vom Trägermaterial, da Chlorophyll in Lösung eine höhere Extinktion zeigt als die Chlorophyll-Träger-Komplexe; oder eine langsam einsetzende Änderung der Eigenschaften des Trägermaterials. Letzten Aufschluß kann daher erst die noch ausstehende genaue Untersuchung der Trägermizellen geben. Jedoch bewies auch dieser Versuch die Überlegenheit des NEKANIL 910 über die beiden daneben verwendeten Netzmittel, so daß für die letzten Experimente nur noch diese Trägersubstanz verwendet wurde.

Die spektroskopischen Daten deuten darauf hin, daß sich ein Komplex ausbildet, in welchem eine wirksame Fortleitung absorbierter Quantenenergien erfolgen kann. Andernfalls wäre nicht die Abstrahlung des Fluoreszenzlichts aus einer Komponente erklärlich, die an der Absorption des Erregerlichts nur zu einem winzigen Bruchteil beteiligt sein kann. Weiterhin lassen die Abschätzungen der Mizellengröße darauf schließen, daß etwa 200 - 300 Chlorophyllmoleküle am Aufbau der Partikel beteiligt

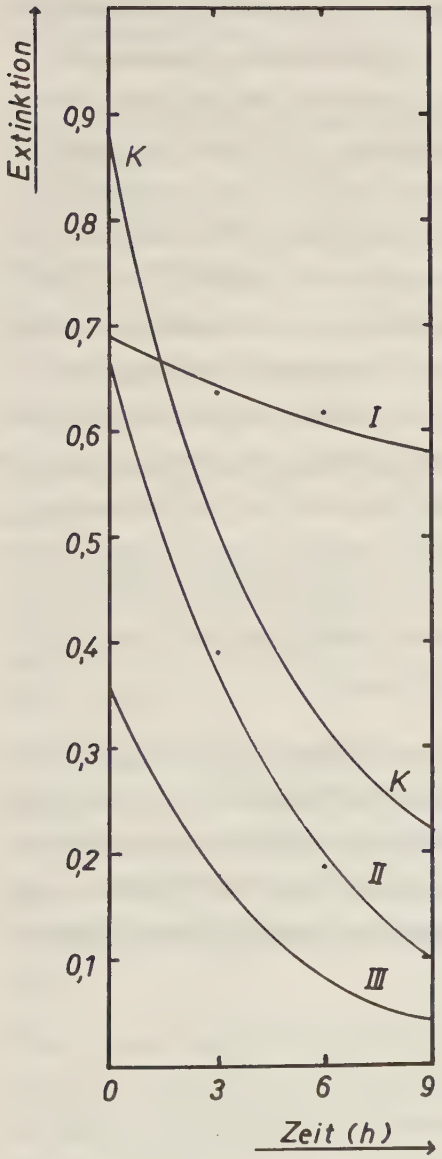


Abb. 19: Beständigkeit der NEKANIL-Chlorophyll-Komplexe unter Einwirkung von Licht und Sauerstoff in Abhängigkeit von der Zeit.

sind. Das aber ist genau die Größe, die heute für die kleinsten Untereinheiten der Grana, die Quantasomen, angenommen wird (PARK 1964). Demnach wäre es denkbar, daß in einem derartigen Komplex Vorgänge ablaufen können, die denen in Granalamellen entsprechen. Selbstverständlich wird eine Beladung der Seifenmizellen ausschließlich mit Chlorophyll ein sehr unvollkommenes Modell abgeben. Dennoch sollte es sinnvoll sein, die photochemischen Fähigkeiten zu messen und mit jenen zu vergleichen, die gelöstem oder kolloidem Chlorophyll zukommen. Die Messungen der lichtbedingten Elektronenübertragung vom Kaliumferrocyanid ($E_0' = 0{,}771$) zum Dichlorphenolindophenol ($E_0' = 0{,}242$) zeigen, daß tatsächlich ein gegen das Gefälle der Redoxpotentiale gerichteter Ladungstransport zustande kommt. Damit liegen hier völlig andere Verhältnisse vor als bei den Eiweiß-Chlorophyll-Komplexen, bei denen MASLOVA (1956) eine Photoreduktion des Ferricyanids zum Ferrocyanid erhielt.

Der sehr viel schwächere Einfluß molekular und kolloid gelösten Chlorophylls auf diese Elektronenübertragung beweist, daß die hergestellten Komplexe Ansatzpunkte für Modellversuche darstellen, durch die Teilprozesse der pflanzlichen Photosynthese ausserhalb der Zelle und ihrer Organellen studiert werden können.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde versucht, ein neues Modellsystem der photosynthetischen Einheit herzustellen und zu charakterisieren.

Als Trägersubstanzen wurden 3 nichtpolare Netzmittel der Fa. BASF verwendet:

1. Paranonylphenol	Werksbezeichnung:	NEKANIL 910
2. ein C_{12}-C_{18}-Fettalkohol	" "	NEKANIL C HOCHKONZ.
3. Ölsäuremonoäthanolamid	"	NEKANIL W EXTRA

An jede dieser Substanzen waren ca. 10 Moleküle Äthylenoxyd angelagert.

Die Absorptionsspektren der künstlichen Chlorophyll a-Träger-Komplexe zeigten im Rotbereich des Chlorophyll a eine Wellenlängenverschiebung von 660 nm nach 668 nm = 8 nm. Die Spektren waren eingipflig.

Die Maxima der Fluoreszenzspektren lagen für den NEKANIL 910-Komplex bei 715 nm, für die anderen beiden Netzmittel bei 710 nm. Es traten Schultern bei 684 nm, 700 nm und 745 nm, resp. 730 nm, 678 nm und 688 nm auf. Die Aufnahmen ähnelten Fluoreszenzspektren von lebenden Zellen von Porphyridium cruentum.

Alle 3 untersuchten Komplexe zeigten sich gegenüber dem Einfluß von Sauerstoff und Licht beständiger als Chlorophyll a in Lösung. Am größten war die Beständigkeit bei dem NEKANIL 910-Chlorophyll a-Komplex.

Dieser Komplex war in der Lage, verschiedene Farbstoffe wie Dichlorphenol-Indophenol zu reduzieren. Bei Zugabe von Ferrocyanid konnte die Bildung von Ferricyanid und die Extinktionsabnahme des Dichlorphenol-Indophenol spektroskopisch nachgewiesen werden.

V. LITERATURNACHWEIS

BECHER, P.: Micelle Formation in aqueous and nonaqueous Solutions. In SCHICK, M. J. (Editor) Nonionic Surfactants. Marcel Dekker Inc., New York 1967

BECKER, W.: Dünnschichtchromatographische Untersuchungen an den Plastidenpigmenten von Porphyridium cruentum. Dipl.-Arbeit aus dem Inst. f. Chem. Pflanzenphysiologie, Tübingen 1967

BRODY, S. S. and BRODY, M.: The Existence of Chlorophyll Aggregates at Room Temperature in vivo and in vitro. Biochim. Biophys. Acta 112/54/1966

CRAIG, L. C.: Identification of small Amounts of Organic Compounds by Distribution Studies, II. J. Biol. Chem. 155/519/1944

DUYSENS, L. N. M.: Transfer of Light Energy within the Pigment-System present in photosynthesizing Cells. Nature, (LONDON) 168/548/1951

DUYSENS, L. N. M.: Transfer of Excitation Energy in Photosynthesis. Diss. Kennik u. Zoon, Utrecht 1952

EMERSON, R. u. ARNOLD, W.: The photochemical Reaction in Photosynthesis. J. Gen. Physiol. 16/191/1933

EMERSON, R. u. LEWIS, C. M.: The photosynthetic efficiency of Phycocyanin in Chroococcus, and the problem of Carotenoid Participation in Photosynthesis.
J. gen. Physiol. 25/579/1942

ENGELMANN, Th. W.: Farbe und Assimilation.
Bot. Ztg. 41/1 u. 17/1883

ENGELMANN, Th. W.: Untersuchungen über die quantitativen Beziehungen zwischen Absorption des Lichtes und Assimilation in Pflanzenzellen.
Bot. Ztg. 42/81 u. 97/1884

ENGELMANN, Th. W.: Die Erscheinungsweise der Sauerstoffausscheidung chlorophyllhaltiger Zellen im Licht bei Anwendung der Bacterienmethode.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 57/375/1894

EISLER, M. u. PORTHEIM, L.: Über die Bildung von Sauerstoff aus Kohlendioxyd durch Eiweiß-Chlorophyllösungen.
Biochem. Zeitschr. 135/293/1923

FÖRSTER, T.: Die Fluoreszenz organischer Verbindungen.
Vandenhoek u. Ruprecht, Göttingen 1951

GOEDHEER, J. C.: Fluorescence Bands and Chlorophyll a Forms.
Biochim. Biophys. Acta 88/304/1964

GOODWIN, T.W.: Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments.
Academic Press London-New York 1965

HAGER, A. und MEYER-BERTENRATH, T.: Die Isolierung und quantitative Bestimmung der Carotinoide und Chlorophylle von Blättern, Algen und isolierten Chloroplasten mit Hilfe dünnschichtchromatographischer Methoden.
Planta 69/198/1966

HAXO, F. T. u. BLINKS, L. R.: Photosynthetic Action Spectra of marine Algae
J. gen. Physiol. 33/398/1950

HECKER, E.: Verteilungsverfahren im Laboratorium.
Monogr. "Angew. Chemie" und "Chem.-Ing.-Techn."
67/98/1955

HILL, R.: Oxygen Evolution by isolated Chloroplasts.
Nature, (LONDON) 139/881/1937

HOUBEN-WEYL: Methoden der organischen Chemie.
Bd. 14/I und 14/II: Makromolekulare Stoffe
Georg-Thieme-Verlag Stuttgart 1961 und 1963

JONES, R. F., SPEER, H. L. u. KURY, W.: Studies on the Growth of the red Alga Porphyridium cruentum.
Physiol. Plant. 16/636/1963

KARJAGIN, A. V. u. CMUTINA, I.A.: Die Untersuchung alkoholischer Lösungen von Farbstoffen und Pigmenten in Gegenwart eines Polyamids.
Zur. Fiz. Chim. 39/1895/1965
Zit. nach Kolloidzeitschr. u. Zeitschr. f. Polymere
212/2/186/1966

KOK, B.: Efficiency of Photosynthesis.
Handbuch der Pflanzenphys. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg VI/566/1960

KOMMISSAROV, G. G., NEKRASOV, L. J. u. KOBOSEV, N. J.:
Position of the red Absorption Maximum of Chlorophyll in the green Leaves and in the Adsorbed State.
Biofizika 9 (5)/625/1964
Ref. Chem. Abstracts 65/29540

KUBELKA, P. u. MUNK, F.: Ein Beitrag zur Optik der Farbanstriche.
Z. tech. Phys. 12/593/1931

LYNCH, V. H. u. FRENCH, C. S. B.: -Carotene, an active Compound of Chloroplasts.
Arch. Biochem. Biophys. 70/382/1957

MASLOVA, T. G. u. SAPOZHNIKOV, D. J.: The State of Chlorophyll in the green Plant Leaves.
Zhur. Khim., Biol. Khim. 1957
Zitiert nach Chem. Abstracts

METZNER, H.: Spektroskopische Messungen an lebenden Algenzellen.
Currents in Photosynthesis, Ad. Donker (Publ.) Rotterdam, 17/1966

METZNER, H., RAU, H. u. SENGER, H.: Untersuchungen zur Synchronisierbarkeit einzelner Pigmentmangel-Mutanten von Chlorella.
Planta 65/186/1965

METZNER, H. u. STRUSS, S.: Gewinnung reiner Chlorophyll a-Präparate durch Gegenstromverteilung von Algenextrakten.
Zeitschr. f. Naturforsch. 18b/107/1963

NEKRASOV, L. J., KOBOSEV, N. J. u. KOMMISSAROV, G. G.: Study of Chlorophyll Adsorption on organic and inorganic Bearers.
Biofizika 7/568/1962
Ber. über d. wiss. Biologie 216/198/1964

NOACK, K.: Der Zustand des Chlorophylls in der lebenden Pflanze.
Biochem. Zeitschr. 183/135/1927

PARK, R. B. u. BIGGINS, J.: Quantasome size and composition
Science 144/1009/1964

RAUEN, H. M.: Biochem. Taschenbuch
Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg 1964

REULE, A.: Fluoreszenz-Meßtechnik.
Sonderdruck CARL ZEISS Oberkochen/Württ.

RODRIGO, F. A.: Experiments concerning the State of Chlorophyll in the Plant.
Diss. Uitgeverej Excelsior, Utrecht 1955

RÖBBELEN, G.: Untersuchungen an strahleninduzierten Blattfarbmutanten von Arabidopsis thaliana.
Zeitschr. f. Vererbungslehre 88/198/1957

SACHS, J.: Über den Einfluß des Lichtes auf die Bildung des Amylums in den Chlorophyllkörnern.
Bot. Ztg. 20/365/1862

SCHICK, M. J.: Nonionic Surfactants.
Marcel Dekker, Inc. New York 1967

SCHWEIZER, H.R.: Künstliche organische Farbstoffe und ihre Zwischenprodukte
Verlag Springer Berlin-Göttingen-Heidelberg 1964

SENGER, H. u. WOLF, H. J.: Eine automatische Verdünnungsanlage und ihre Anwendung zur Erzielung homokontinuierlicher Chlorella-Kulturen.
Arch. Mikrobiol. 48/81/1964

SEYBOLD, A. u. EGLE, K.: Über den physikalischen Zustand des Chlorophylls in den Plastiden.
Botan. Arch. 41/578/1940

SIDKO, F. Y., TERSKOV, J. A. u. EROSHIN, M. S.: Spektroskopiya, Metody i Primenenie Akad. Nauk. SSSR., Sibirsk. Otd.
185/1964
zit. nach Chem. Abstr.

SIRONVAL, C. u. MICHEL, M.R.: On the Nature and possible Functions of the 673 and 684 nm Forms in vivo of Chlorophyll.
Biochim. Biophys. Acta 94/344/1965

STOLL, A. u. WIEDEMANN, E.: Die kristallisierten natürlichen Chlorophylle a und b.
Hel. Chim. Acta 42/679/1959

TANADA, T.: The photosynthetic efficiency of Carotenoidpigments in Navicula minema.
Amer. J. Bot. 38/276/1951

VISHNIAC, W.: Light-dependent Reductions in a Cell-free System. Research in Photosynthesis, edit. by H. Gaffron
285 N.Y. 1957

WASSINK, E. C., KATZ, E. u. DORRSTEIN, P.: Infrarot-Absorptionsspektren verschiedener Stämme von Purpurbakterien. Enzymologia 7/113/1939

ZIEGLER, R. u. EGLE, K.: Zur quantitativen Analyse der Chloroplastenpigmente. Kritische Überprüfung der spektralphotometrischen Chlorophyllbestimmung. Beitr. Biol. Pflanzen 41/11/1965

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. H. Metzner, danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, für seinen wertvollen Rat und die großzügige Unterstützung der Arbeit.

LEBENSLAUF

Am 24. Februar 1941 wurde ich, Brigitte Renate Wagner, als Tochter des kaufmännischen Angestellten Gerhard Wagner und seiner Ehefrau Carla, geb. Brandt, in Berlin geboren.
Am 1. September 1947 wurde ich in Berlin-Schöneberg in die Werbellinsee-Grundschule eingeschult. Vom 15. Juni 1951 an besuchte ich die private St. Franziskus-Oberschule, ein Neusprachliches Gymnasium für Mädchen, wo ich am 14. März 1960 das Abitur ablegte.

Mit Beginn des Wintersemesters 1960 bis zum Sommersemester 1963 war ich an der Freien Universität Berlin in der Math.-nat. Fakultät für die Fächer Botanik, Zoologie und Chemie eingeschrieben. Vom Sommersemester 1963 an setzte ich mein Studium an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen fort. Hier arbeitete ich vom Herbst 1964 bis zum Winter 1967 am Institut für chemische Pflanzenphysiologie unter der Leitung von Herrn Professor Dr. H. Metzner über das Thema " Spektroskopische und photochemische Untersuchungen an chlorophyllhaltigen Netzmittelmizellen ".

Meine akademischen Lehrer waren im besonderen:
die Herren Professoren Jahr, Lassen, Lüers und Schenk, Frau Professor Thielke, die Herren Professoren Ulrich und Urich in Berlin; die Herren Professoren Bünning, Metzner und Weitzel in Tübingen.